

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DÉTERMINATION DES EFFETS BIOCHIMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES
DE LA CAPTATION SÉLECTIVE DES ESTERS DE CHOLESTÉROL DES
LIPOPROTÉINES DE FAIBLE DENSITÉ PAR LE RÉCEPTEUR
«SCAVENGER» DE CLASSE B, TYPE I

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
SONIA ALEM

AVRIL 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice de recherche, madame Louise BRISSETTE, pour la confiance témoignée en mes capacités de réalisation de mon projet de recherche, pour toutes les connaissances transmises, pour sa générosité, sa disponibilité, ses efforts, ses encouragements et surtout pour sa capacité d'être à l'écoute des autres.

Mes remerciements sont également adressés à madame Louise FALSTRAULT, technicienne de recherche, qui a été d'une aide précieuse pour nous tous, ainsi qu'à tout le personnel de laboratoire et de l'animalerie qui ont toujours été disponibles lorsque requis.

Je tiens également à remercier les professeurs Robert MOREAU, Julie LAFOND et Diana AVERILL pour m'avoir permis d'utiliser leur laboratoire et leurs appareils.

Finalement, mes plus sincères remerciements à mon conjoint, les membres de ma famille et de ma belle-famille, qui m'ont encouragée tout au long de mon parcours universitaire.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	vi
RÉSUMÉ.....	ix
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Les lipoprotéines.....	1
1.1.1 Les chylomicrons.....	2
1.1.2 Les VLDL.....	4
1.1.3 Les IDL.....	4
1.1.4 Les LDL.....	5
1.1.5 Les HDL.....	5
1.1.6 Les apolipoprotéines.....	6
1.2 Le métabolisme des lipoprotéines.....	9
1.2.1 Les récepteurs menant à la captation globale	9
1.2.2 Le SR-BI.....	14
1.3 La problématique.....	17
1.4 Les hypothèses.....	18
CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	20
2.1 Matériel.....	20
2.2 Méthodes.....	20
2.2.1 L'isolement des lipoprotéines.....	22
2.2.2 Les différentes caractéristiques des LDL.....	23
2.3 Autres méthodes.....	30
CHAPITRE III	
RÉSULTATS.....	31

3.1 La composition en triglycérides, cholestérol et esters de cholestérol des différentes sous-classes de LDL natives et modifiées.....	31
3.1.1 Les triglycérides.....	31
3.1.2 Le cholestérol total, cholestérol libre et esters de cholestérol.....	33
3.2 La taille des différentes sous-classes de LDL.....	36
3.3 La charge des différentes sous-classes de LDL.....	37
3.4 La densité des différentes sous-classes de LDL.....	38
3.5 L'oxydation des différentes sous-classes de LDL.....	39
3.6 Le transfert des esters de cholestérol des ^3H -EC-HDL ₃ vers les différentes sous-classes de LDL par l'action de la CETP.....	42
3.7 L'association des LDL ₁ et des LDL ₂ natives et modifiées aux cellules HepG2.....	44
3.8 Critères de la liaison des LDL ₁ natives et modifiées et des LDL ₂ natives et modifiées aux rLDL des cellules HepG2.....	48
CHAPITRE IV	
DISCUSSION.....	52
4.1 La composition chimique des LDL.....	52
4.2 La taille et la densité des LDL.....	55
4.3 La charge des LDL.....	57
4.4 L'oxydation des LDL <i>in vitro</i>	58
4.5 Le transfert des EC des ^3H -EC-HDL ₃ vers les différentes sous-classes des LDL.....	59
4.6 Métabolisme et liaison des LDL aux SR-BI et rLDL des cellules HepG2.....	60
4.7 Analyse globale des effets de la captation sélective et des implications sur le caractère athérogène des LDL.....	62
4.8 Perspectives.....	63
CONCLUSION.....	65
BIBLIOGRAPHIE.....	67

LISTE DES FIGURES

Figures	Page
1.1 Structure générale d'une lipoprotéine.....	2
1.2 Structure du rLDL.....	10
1.3 Structure du SR-BI.....	15
3.1 Composition en triglycérides des sous-classes de LDL natives et modifiées.....	32
3.2 Composition en cholestérol total, libre et esters de cholestérol des sous-classes de LDL natives et modifiées.....	35
3.3 Taille des différentes sous-classes de LDL ayant subies ou non de la captation sélective <i>in vivo</i>	36
3.4 Charge électrique des différentes sous-classes de LDL ayant subies ou non de la captation sélective <i>in vivo</i>	37
3.5 Densité des différentes sous-classes de LDL ayant subies ou non de la captation sélective <i>in vivo</i>	38
3.6 Courbe cinétique d'oxydation des différentes sous-classes de LDL ayant subies ou non de la captation sélective <i>in vivo</i>	41
3.7 Transfert des esters de cholestérol des ³ H-EC-HDL ₃ vers les LDL par la CETP.....	43
3.8 Étude <i>in vitro</i> du métabolisme des LDL ₁ natives et modifiées par les cellules HepG2 à une concentration de 20 µg/ml	46
3.9 Étude <i>in vitro</i> du métabolisme des LDL ₂ natives et modifiées par les cellules HepG2 à une concentration de 40 µg/ml	47
3.10 Liaison des ¹²⁵ I-LDL ₁ et ¹²⁵ I-LDL ₂ natives et modifiées avec les cellules HepG2.....	51

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Les différentes classes de lipoprotéines, leurs densités, leurs tailles, leurs compositions relatives en lipides et en protéines et les apolipoprotéines qui les constituent.....	3
1.2 Propriétés et fonctions métaboliques des apolipoprotéines.....	8
3.1 Les paramètres d'oxydation <i>in vitro</i> des différentes sous-classes de LDL natives et modifiées.....	41
3.2 Les paramètres (Kd et Bmax) de la liaison spécifique des ^{125}I -LDL ₁ et ^{125}I -LDL ₂ aux cellules HepG2.....	51

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES
ET ACRONYMES

ABCA1	«ATP-binding cassette, sub-family A, member 1»
ACAT	Acyl-CoA: cholestérol acyltransférase
Apo	Apolipoprotéines
Bmax	Capacité maximale de liaison
BSA	Albumine de sérum bovin
CD36	«Cluster of differentiation 36»
CETP	Protéine de transfert des esters de cholestérol
CL	Cholestérol libre
CM	Chylomicrons
EC	Esters de cholestérol
EDTA	Tétraacétate d'éthylène diamine
EGF	Facteur de croissance épidermique
FBS	Sérum fœtal bovin
HDL	Lipoprotéines de haute densité
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HMGCoA	Hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A
IDL	Lipoprotéines de densité intermédiaire
Kd	Constante de dissociation
LCAT	Lécithine : cholestérol acyltransférase
LDL	Lipoprotéines de faible densité

LDLac	Lipoprotéines de faible densité acétylées
LDLox	Lipoprotéines de faible densité oxydées
LH	Lipase hépatique
LOX-1	Récepteur qui lie les lipoprotéines de faible densité oxydées
LPL	Lipoprotéine lipase
LRP	Protéine apparentée au récepteur de lipoprotéines de faible densité
MEM	Milieu minimum essentiel
MTP	Protéine microsomale de transfert des triglycérides
NDGGE	Électrophorèse sur gradient de gel polyacrylamide non dénaturant
PBS	Tampon phosphate salin
PCSK9	«Proprotéine convertase substilisine/kexine type 9»
PL	Phospholipides
PLTP	Protéine de transfert des phospholipides
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyl
rLDL	Récepteur de lipoprotéines de faible densité
SCAP	«Sterol responsive element binding protein cleavage-activating protein»
S1P	Site 1 protéase
S2P	Site 2 protéase
SR-A	Récepteur «scavenger» de classe A
SR-BI	Récepteur «scavenger» de classe B, type I
SREBP	«Sterol responsive element binding protein»
TBE	Tampon tris-borate-EDTA

TBS	Tampon tris salin
TCA	Acide trichloracétique
TG	Triglycérides
TLR	Récepteur de type Toll
VLDL	Lipoprotéines de très faible densité

RÉSUMÉ

Le cholestérol est véhiculé dans le sang par les lipoprotéines de faible densité (LDL), du foie vers les cellules. Ces LDL se divisent en 3 sous-classes (LDL₁, LDL₂ et LDL₃). Elles sont métabolisées soit par captation sélective par le récepteur «scavenger» de classe B, type I (SR-BI) qui permet de capter uniquement leurs esters de cholestérol (EC) ou par captation globale par le récepteur de LDL (rLDL). Des études réalisées par le groupe de Madame Brissette ont démontré que des LDL injectées à des souris et ré-isolées quelques heures plus tard se retrouvent appauvries en EC et sont de plus petites tailles. Ces études ont donc établi le phénomène de la captation sélective des EC des LDL *in vivo*. Le sujet de ce mémoire est l'étude de l'effet de la captation sélective sur les LDL₁, LDL₂ et LDL₃. Pour cela, des souris CD1 ont été injectées avec 3 mg de LDL₁, LDL₂ et LDL₃ natives et 5 heures plus tard, les LDL modifiées ont été isolées par ultracentrifugation. Le travail expérimental subséquent a permis de déterminer les caractéristiques de chacun des types de LDL à savoir leur composition chimique par dosage enzymatique; taille par électrophorèse sur gradient de gel de polyacrylamide; densité par la procédure de Terpstra; charge selon leurs migrations sur gel d'agarose-barbital; niveau d'oxydation des LDL après une incubation avec du CuSO₄; capacité à accepter les EC des HDL₃ par la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP); activité de captation sélective des EC de SR-BI des cellules HepG2 envers les différents types de LDL et leurs affinités de liaison pour le rLDL. Les résultats ont démontré qu'il y a une diminution de 15% en EC pour les LDL₁ modifiées et de 58% et 41% en triglycérides (TG) pour les LDL₁ et LDL₂ modifiées. Il y a eu également un enrichissement en cholestérol total (CT) et cholestérol libre (CL) pour chacune des 3 sous-classes de LDL modifiées. Les résultats ont également démontré que, par rapport à leurs formes natives respectives, les LDL₁ modifiées sont plus denses, plus petites et sont chargées plus négativement, les LDL₃ modifiées sont moins denses, plus grosses et plus chargées négativement, alors que les LDL₂ modifiées sont moins chargées négativement et ne démontrent pas de différence de taille et de densité. Toutes les sous-classes de LDL modifiées semblent être plus sensibles à l'oxydation, ce qui à première vue semble néfaste. Les résultats de transfert des EC des HDL₃ vers les sous-classes de LDL ne démontrent aucune différence significative entre les différentes sous-classes natives et modifiées mais il y a 11% moins de transfert des EC aux LDL₃ natives qu'aux LDL₁ natives et une tendance à la diminution pour les LDL₃ natives par rapport aux LDL₂ natives. L'étude *in vitro* avec des cellules HepG2 a démontré qu'il y a une augmentation de 90% de la captation sélective pour les LDL₁ modifiées alors qu'il y a une diminution de 46%

pour les LDL₂ modifiées, par rapport à leurs formes natives. Aussi, une augmentation de 56% d'affinité de liaison envers le rLDL est observée pour les LDL₁ et LDL₂ modifiées, par rapport à leurs formes natives. Ainsi, la captation sélective des EC dans la circulation sanguine par le SR-BI favoriserait la dégradation des LDL₁ et LDL₂, *in vivo*, ce qui est bénéfique pour l'organisme et permettrait donc la réduction des risques cardiovasculaires. D'autres études sont nécessaires afin de tester les LDL₃ sur les cellules HepG2.

Mots clés : captation sélective, SR-BI, rLDL, sous-classes de LDL.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Les lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des complexes lipidiques stabilisés par des protéines nommées apolipoprotéines (apo) qui assurent la distribution du cholestérol et des TG dans le sang. Elles sont composées d'un noyau hydrophobe, comprenant les TG et les EC, entouré d'une monocouche de phospholipides (PL), de CL et d'apo (Scanu & Landsberger, 1980). La figure 1.1 illustre bien la structure globale des lipoprotéines. Ainsi, les lipides polaires (PL et CL) sont situés sur la partie extérieure formant ainsi le revêtement de la lipoprotéine alors que les lipides les plus hydrophobes (TG et EC) sont situés dans le noyau de la particule constituant le cœur lipidique des lipoprotéines. Il existe différents types d'apolipoprotéines constitutives de lipoprotéines. Ces lipoprotéines se divisent en différentes classes selon leurs densités, leurs tailles, leurs compositions relatives en lipides et en protéines et leurs compositions en apo (Mathews *et al.* 2000), tel que démontré dans le tableau 1.1.

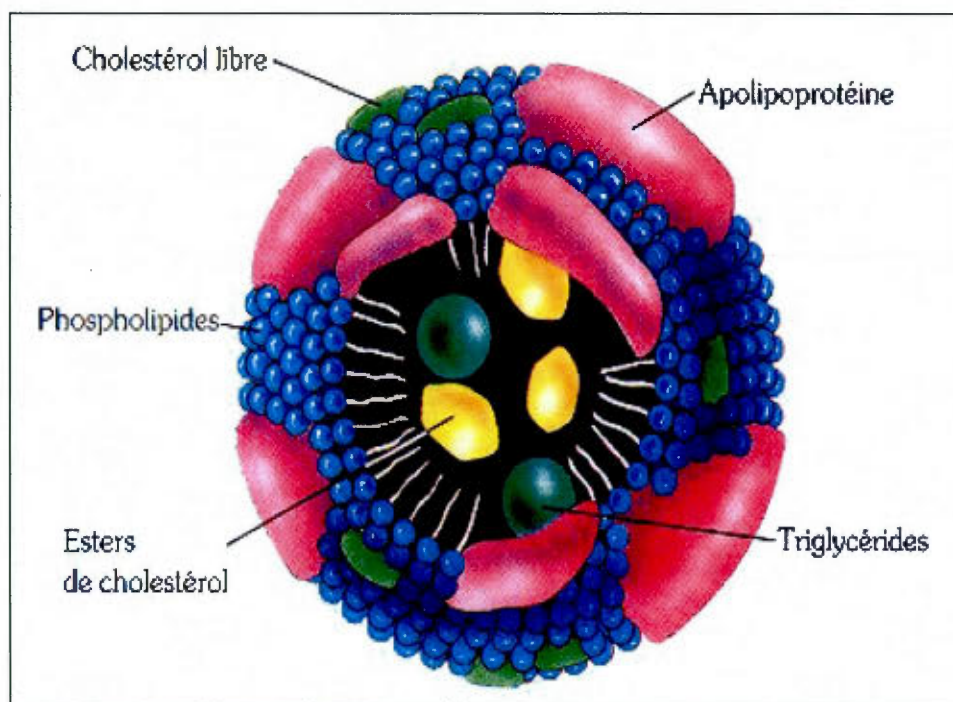


Figure 1.1 : Structure générale d'une lipoprotéine.

Les lipoprotéines sont des structures hydrosolubles constituées de lipides et de protéines. Le noyau de la lipoprotéine contient des TG et des EC alors que l'enveloppe se compose de PL, CL et d'apolipoprotéines (dans ce cas c'est l'apoB-100 qui assure le maintien de la structure des LDL). Tiré de : http://www.pharmaciedelepoulle.com/Cholesterol_hyperlipidemie.htm.

1.1.1 Les chylomicrons

Les chylomicrons (CM), constitués d'apo B-48 et d'apo A-I, sont synthétisés dans les intestins et sont responsables du transport des lipides alimentaires des intestins aux tissus. Une fois que la particule de CM a atteint le compartiment plasmatique, l'apo A-I se dissocie très rapidement (Vinge & Havel, 1981) et le CM acquiert des apo Cs afin de permettre un déchargement efficace de la teneur des TG après sa liaison à la lipoprotéine lipase (LPL) qui est liée à l'endothélium (Patsch, 1987).

Tableau 1.1 : Les différentes classes de lipoprotéines, leurs densités, leurs tailles, leurs compositions relatives en lipides et en protéines et les apolipoprotéines qui les constituent.

Classes de lipoprotéines	Densité (g/ml)	Taille (nm)	Composition		
			Protéines (%)	Lipides (% TG, EC, CL, PL)	Apolipoprotéines
CM	< 0,95	100 à 1000	2	83, 3, 2, 7	A-I, A-II, C-I, C-III, B-48
VLDL	0,95-1,006	30 à 80	7	50, 17, 7, 20	B-100, C-I, C-II, C-III, E
IDL	1,006-1,019	25 à 40	15	31, 23, 7, 22	B-100, E
LDL	1,019-1,063	21 à 29	22	6, 42, 8, 22	B-100
	LDL ₁	26,6 à 28,5	18	7, 43, 9, 22	
	LDL ₂	25,6 à 26,6	19	4, 44, 10, 23	
	LDL ₃	22 à 25,5	22	3, 46, 8, 21	
HDL	1,063-1,21	8 à 12	40 à 55	8, 12-20, 4, 22	A-I, A-II, E, D, Cs
Sous- classes de HDL	HDL ₂	10 à 13	43	2, 20, 5, 30	
	HDL ₃	7 à 10	55	1, 16, 3, 25	

Tiré de Berneis & Krauss 2002, Campos *et al.* 1996, Dejager, 1996, Ginsberg *et al.* 1999, Grandjean & Crouse, 2004, Mahley *et al.* 1984, Mathews *et al.* 2000, MC Namara *et al.* 1996, Rouffy *et al.* 1983 et Teng *et al.* 1983.

Les acides gras libérés lors de l'hydrolyse par la LPL sont utilisés comme source d'énergie par différentes cellules ou sont repris par les adipocytes où ils seront stockés sous forme de TG. Les particules de lipoprotéines générées suite à l'action des LPL sont nommées résidus de CM. Ces particules sont enrichies en cholestérol et rapidement éliminées par le foie.

1.1.2 Les VLDL

Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) sont des molécules très riches en triglycérides qui sont sécrétées par le foie. Chaque molécule de VLDL contient une molécule d'apo B-100. L'assemblage des VLDL dans les hépatocytes est réalisé par la protéine de transfert des triglycérides microsomaux (MTP), une protéine résidente du réticulum endoplasmique. Les triglycérides des VLDL sont hydrolysés par la LPL et par la lipase hépatique (LH). La structure de cette dernière enzyme est homologue à celle de la LPL mais est exclusivement synthétisée par les cellules du foie et a de plus une activité de phospholipase. Comme pour les chylomicrons, cette hydrolyse permet la libération d'acides gras non estérifiés pour les tissus (Andreelli & Jacquier, 2006). De plus, les VLDL de la même façon que les CM, acquièrent des apo C-II et des apo E dans le sang. Ces apo C-II seront responsables de l'activation des LPL et de l'hydrolyse des TG. Ainsi la proportion du cholestérol dans les VLDL augmentera suite à l'hydrolyse.

1.1.3 Les IDL

Les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) sont issues de l'hydrolyse des TG des VLDL par l'action de la LPL et de la LH (Mahley *et al.* 1984). Une partie des IDL est internalisée et dégradée dans le foie par les rLDL et une autre partie des IDL continue à subir une hydrolyse de leurs TG par les LPL et LH. C'est ainsi que les IDL deviennent des LDL. Les LDL sont donc considérées comme des produits finaux issus du catabolisme des VLDL et des IDL (Mahley *et al.* 1984).

1.1.4 Les LDL

Les LDL transportent le cholestérol vers les cellules qui en ont besoin. Une seule molécule d'apo B-100 est présente afin d'assurer le maintien de la structure de la particule. De multiples sous-fractions de LDL ont été identifiées (Dejager, 1996). Ces sous-fractions ont été définies de différentes façons telles leurs tailles, leurs masses moléculaires, leurs densités, leurs compositions en lipides et en apolipoprotéines, leurs propriétés hydrodynamiques, leurs charges électriques de surface et dans l'expression de certains épitopes de l'apo B. Ainsi, les LDL sont divisées en trois phénotypes selon leurs tailles décroissantes: phénotype A (LDL₁), phénotype I (LDL₂), phénotype B (LDL₃). Des études ont démontré que 65 à 75% de la population générale a un phénotype A, 20 à 30% un phénotype B et seulement 15 à 20% possède le phénotype I (Austin & Krauss, 1986 ; Austin *et al.* 1988). Même si toutes les LDL sont athérogènes, les LDL petites et denses, soit les LDL₃ sont considérées comme étant la sous-classe la plus athérogène (Berneis & Krauss, 2002). Elles possèdent une moins bonne affinité pour le rLDL (Nigon *et al.* 1991). Elles sont donc moins efficacement épurées de la circulation et ont, de ce fait, une demi-vie prolongée (Dejager *et al.* 1995), ce qui les expose davantage à des modifications oxydatives (Brockes *et al.* 2002). Les LDL petites et denses sont significativement associées au développement des maladies cardiovasculaires (Arai *et al.* 2013).

1.1.5 Les HDL

Les lipoprotéines de haute densité (HDL) sont des particules riches en cholestérol qui sont impliquées dans le mécanisme de transport inverse du cholestérol (Eisenberg, 1984) d'où leur caractère antiathérogène. Les HDL ont 2 origines : synthèse hépatique et produit du métabolisme des CM et des VLDL. Ces HDL sont synthétisées sous forme discoïdale très pauvre en lipides et ne contenant que du CL et des PL. Sous l'action de la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT), le CL qui était à la surface de la particule de HDL va être estérifié et va migrer au

centre de cette lipoprotéine. Une nouvelle molécule de CL, issue de la membrane cellulaire, pourra se remettre à la périphérie de la particule de HDL. Cet efflux de cholestérol de la cellule s'effectue vers l'apo A-I des HDL qui se fixe sur un transporteur «ATP-binding cassette, sub-family A, member 1» (ABCA1) situé dans la membrane cellulaire et qui constitue un pore par lequel la molécule de cholestérol va migrer de la cellule vers les HDL. Les HDL s'arrondissent au fur et à mesure qu'elles se chargent d'EC qui seront véhiculés jusqu'au foie pour être capté par le SR-BI. De plus, les HDL peuvent céder leurs EC par le biais de la CETP (Barter *et al.* 1982). La CETP est responsable du transfert de lipides dans le plasma (EC, TG) et d'une partie des transferts de PL (Hesler *et al.* 1987). La protéine de transfert des phospholipides (PLTP) permet également le transfert des PL des VLDL vers les HDL. Dans le plasma, la CETP permet essentiellement le transfert d'EC des HDL vers les lipoprotéines contenant l'apo B-100 (VLDL, IDL et LDL) en échange de TG et, moindrement, d'EC des LDL vers les lipoprotéines riches en TG en échange de TG (Carr *et al.* 2002). Ainsi, lorsque les LDL enrichies en EC provenant de l'efflux de cholestérol fait par les HDL seront captées par le foie par la voie du rLDL ou de SR-BI, ceci contribuera au transport inverse du cholestérol qui réfère au mouvement du cholestérol des tissus périphériques vers le foie. Notons que la CETP est absente chez la souris (Escolà-Gil *et al.* 2001; Luo & Tall, 2000).

1.1.6 Les apolipoprotéines

Les apolipoprotéines sont des protéines constitutives des lipoprotéines chargées de transporter des molécules hydrophobes (TG, cholestérol) dans le sang. D'un point de vue structurel, ces apolipoprotéines possèdent une caractéristique commune qui est leur amphiphilicité. Les apolipoprotéines majeures sont les apo E, apo B, apo A-I, apo A-II, apo A-IV, apo C-I, apo C-II et apo C-III (comme illustré dans le tableau 1.2) (Alaupovic, 1972). Elles jouent un rôle important dans le maintien de la structure des lipoprotéines, dans la régulation du métabolisme des lipoprotéines, agissant même comme cofacteur des enzymes du métabolisme

des lipides, et dans le transport et la redistribution des lipides entre les différents tissus (Mahley *et al.* 1984). Toutes les informations biochimiques et métaboliques des différentes apolipoprotéines apparaissent au tableau 1.2.

Tableau 1.2 : Propriétés et fonctions métaboliques des apolipoprotéines.

Apolipoprotéines	Concentration plasmatique g/l	Poids moléculaire kDa	Lieu de synthèse	Rôles métaboliques
A-I	1,1-1,7	28,3	foie	Cofacteur indispensable à l'activation de la LCAT Structure des HDL
A-II	0,4-0,6	17,5	intestin	Cofacteur de la LH Structure des HDL
A-IV	0,16	46	intestin	Activation de la LCAT Structure des chylomicrons et des HDL
B-48	Absente à jeun	264	intestin	Transport des lipides alimentaires par la synthèse des chylomicrons Structure des chylomicrons
B-100	0,6-1,2	549	foie	Structure des VLDL, LDL Liaison au rLDL
C-I	0,04-0,06	6,3	foie	Activation de la LCAT Inhibiteur de la captation sélective des EC des LDL et des HDL
C-II	0,03-0,05	8,8	foie	Activation de la LPL Inhibiteur de la captation sélective des EC des LDL et des HDL
C-III	0,12-0,14	8,8	foie	Activateur de la LPL Inhibiteur de la captation sélective des EC des LDL et des HDL
E	0,025-0,050	34	foie, macrophages, cerveau	Ligand pour le rLDL et la protéine apparentée au rLDL (LRP)

Tiré de Dallongeville, 2006, Huard *et al.* 2005, Krasteva *et al.* 2010, Lagrost *et al.* 2003, Law *et al.* 1986, Montine *et al.* 1998, Silvia *et al.* 2001 et Calvert & Abbev. 1985.

1.2 Le métabolisme des lipoprotéines

1.2.1 Les récepteurs menant à la captation globale

1.2.1.1 Le rLDL

1.2.1.1.1 La structure du rLDL et ses lieux d'expression

Le rLDL est une glycoprotéine de 839 acides aminés de 160 kDa responsable de la captation globale des LDL (Goldstein & Brown, 1973). La vaste majorité des cellules expriment ce récepteur, mais de façon quantitative, le foie est le site le plus important de son expression. Tel que le démontre la figure 1.2, de l'extrémité N-terminale, on distingue 5 domaines fonctionnels. Le premier domaine est responsable de la liaison au ligand. Il est constitué de 7 répétitions d'une séquence riche en cystéines analogue à celle de la fraction 9 du complément (Yamamoto *et al.* 1984). Les répétitions 2 à 7 sont impliquées dans la fixation des LDL, alors que la première répétition est très antigénique. Le second domaine présente une homologie de structure avec le précurseur du facteur de croissance épidermique (EGF). Il comporte 3 séquences répétées riches en cystéines analogues à celles de l'EGF et entre les répétitions 2 et 3 se trouvent 5 copies du domaine YWTD jouant un rôle dans la dissociation ligand-récepteur après l'endocytose (Springer, 1998). Le 3^{ème} domaine est fortement glycosylé. Le 4^{ème} domaine est transmembranaire. Le dernier domaine est intracytoplasmique et il comporte un signal d'internalisation NPVY interagissant avec la clathrine.

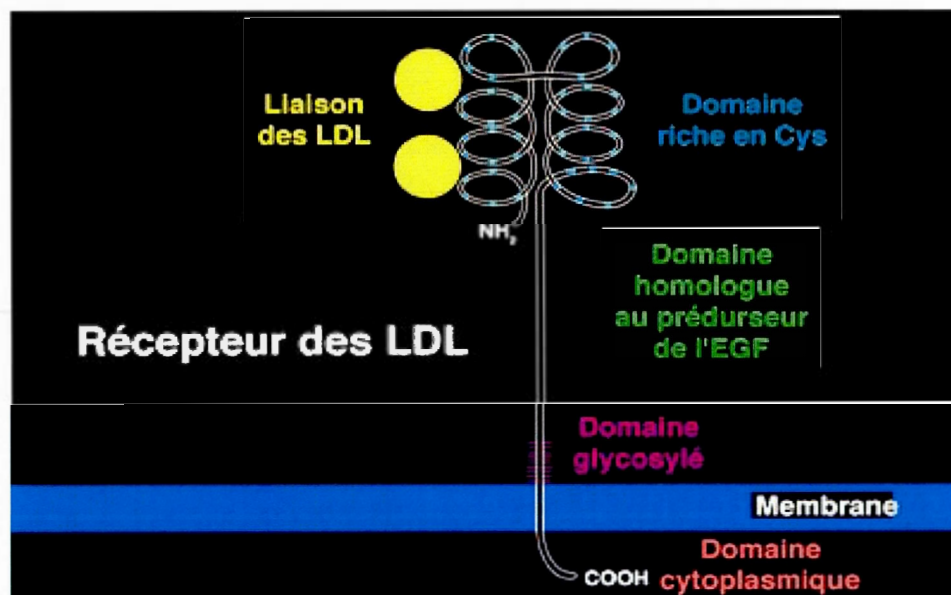


Figure 1.2 : Structure du rLDL

De l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale, le rLDL a cinq domaines : un domaine de liaison riche en cystéines comprenant quatre sites de fixation du ligand (LDL), un domaine homologue au récepteur de l'EGF, un domaine glycosylé, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique. Tiré de <http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/SFbioch/POLY.Chp.5.html>.

1.2.1.1.2 La voie du rLDL et sa régulation

La voie cellulaire d'endocytose des LDL par le rLDL est en fait, un mécanisme cellulaire universel, rétro-régulé, qui a été initialement décrit par l'équipe des Drs Brown et Goldstein (Brown *et al.* 1973). Dans une première étape, les LDL circulantes se fixent à leurs récepteurs localisés dans la membrane plasmique (Brown

& Goldstein, 1986). Dans une seconde étape, au niveau des puits recouverts de clathrines, ces lipoprotéines ainsi que leurs récepteurs sont internalisés par endocytose. Les récepteurs peuvent être recyclés, tandis que les vésicules contenant les LDL se retrouvent par la suite dans les lysosomes où tous les constituants, lipidiques et protéiques, sont dégradés (captation globale). Le cholestérol libre ainsi libéré va permettre trois principaux types de régulation : la diminution de la synthèse endogène du cholestérol par la rétro inhibition de l'hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase, l'augmentation d'estérification du cholestérol par l'enzyme acyl-CoA: cholestérol acyltransférase (ACAT) et de son stockage, et la diminution de la synthèse des rLDL. La transcription du gène du rLDL et de certains autres gènes nécessaires pour la synthèse du cholestérol et des acides gras sont contrôlés par des facteurs de transcription appelés «Sterol responsive element binding protein» (SREBP) (Horton *et al.* 2002). Les SREBPs sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs qui sont ancrés dans la membrane du réticulum endoplasmique grâce à deux domaines transmembranaires (Hua *et al.* 1996). Lorsque le milieu intracellulaire est pauvre en cholestérol, les SREBPs sont transportées vers l'appareil de Golgi par des «Sterol responsive element binding protein cleavage-activating proteins» (SCAP) où elles sont clivées par les protéases S1P (site 1 protéase) et S2P (site 2 protéase), libérant ainsi un fragment soluble qui pénètre dans le noyau de la cellule. Ce fragment active, entre autres, la transcription des gènes codant pour la HMG-CoA réductase ainsi que le rLDL (Horton *et al.* 2002). Quand le cholestérol s'accumule dans le réticulum endoplasmique, il bloque le transport de SREBPs à l'appareil de Golgi, bloquant ainsi la libération protéolytique des fragments actifs de SREBPs. La transcription des gènes cibles baisse.

L'activité du rLDL est aussi contrôlée au niveau post-traductionnel par la dégradation ciblée à travers l'action de la pro-protéine «convertase subtilisine/kexine type 9» (PCSK9) (Goldstein & Brown, 2009 ; Maxwell & Breslow, 2004). PCSK9 accentue la dégradation du rLDL tout en augmentant les niveaux de LDL-cholestérol

plasmatiques (Abifadel *et al.* 2003), alors que la déficience de PCSK9 entraîne une diminution du taux de LDL-cholestérol (Cohen *et al.* 2005).

L'importance physiologique du rLDL a été révélée chez l'humain par la maladie génétique connue sous le nom d'hypercholestérolémie familiale qui est associée à différents types de mutation dans le gène du rLDL (Hobbs *et al.* 1992). D'autres études réalisées avec des lipoprotéines marquées à l'iode-125 ont démontré que la clairance des IDL et des LDL était retardée provoquant ainsi plus de conversion de IDL en LDL chez les humains déficients en rLDL (Soutar *et al.* 1982). Les humains souffrant d'hypercholestérolémie familiale ont un taux très élevé de IDL et LDL et développent de l'athérosclérose à un jeune âge. Ishibashi *et al.* (1993 ; 1994) ont développé un modèle de souris déficientes en rLDL. D'ailleurs, les résultats ont démontré que ces souris avaient une défaillance dans la clairance des IDL et des LDL plasmatiques et évidemment une hypercholestérolémie.

1.2.1.2 La LRP

La protéine apparentée au rLDL (LRP) est un récepteur menant à un mécanisme d'endocytose qui a été identifié en 1988 (Herz *et al.* 1988) en tant que molécule qui reconnaît uniquement l'apo E et non pas l'apo B-100. Lorsque la LRP1 a été identifiée, sa structure similaire au rLDL et son expression dans le foie laissa suggérer un rôle dans le métabolisme des lipoprotéines et dans l'homéostasie du cholestérol (Herz *et al.* 1992). Le rôle de la LRP1 dans le métabolisme des lipoprotéines a été renforcé par plusieurs études qui révèlent que la LRP1 se lie non seulement aux résidus de chylomicrons mais aussi aux lipases qui sont impliquées dans la production de résidus de chylomicrons (Beisiegel *et al.* 1991). Ce récepteur ne sera pas décrit davantage puisqu'il n'interagit pas avec les LDL.

1.2.1.3 Les récepteurs de LDLox (type éboueur)

Les récepteurs de LDLox (LDL oxydées) seront décrits puisqu'il existe une possibilité que l'activité de SR-BI sur les LDL entraîne l'oxydation de ces dernières. Ils ne seront toutefois décrits que brièvement. Le «cluster of differentiation 36» (CD36) a un poids moléculaire de 88 kDa et est composé de 471 acides aminés (Endemann *et al.* 1993). Ce récepteur lie les VLDL, LDL et HDL et les LDLox (Acton *et al.* 1996 ; Calvo *et al.* 1998) et a une structure similaire à celle de SR-BI qui sera décrite plus loin (Oquendo *et al.* 1989). Chez les mammifères, le CD36 est présent à la surface de nombreux types cellulaires tels les macrophages, les cellules dendritiques, les hépatocytes, les adipocytes, les cellules musculaires, les myocytes, les cellules de l'endothélium micro-vasculaire et de l'épithélium du sein, du rein et des intestins (Febbraio *et al.* 2001). L'étude réalisée dans notre laboratoire a démontré que le CD36 joue un rôle, *in vivo*, dans la captation sélective des EC des LDL en l'absence de SR-BI et qu'il est impliqué dans la clairance plasmatique des LDLox par la voie de la captation globale (Luangrath *et al.* 2008).

En plus de CD36, il y a les récepteurs «scavenger» de type A (SR-A), le récepteur qui lie les LDL oxydées (LOX-1), les récepteurs de type Toll (TLRs) et le CD68. Tous ces récepteurs scavenger sont impliqués dans l'athérosclérose et ont une affinité différente pour les LDLox selon leur degré d'oxydation. Par exemple, le CD36 a plus d'affinité pour les LDL modérément oxydées que pour les LDL fortement oxydées (Moore *et al.* 2005; Van Berkel *et al.* 2005). Les TLRs sont exprimés par les macrophages, les lymphocytes et les cellules vasculaires. Cependant, certains TLR, tel que TLR4, lient les LDLox et participent ainsi à la réaction inflammatoire qui se développe dans les plaques (De Kleijn & Pasterkamp, 2003). Le SR-BI peut aussi lier les LDLox *in vitro*, toutefois les travaux de Luangrath *et al.* (2008) ont rejeté un rôle de ce récepteur dans la captation de LDLox *in vivo* chez la souris. Ce récepteur sera

toutefois décrit en détails plus loin pour sa capacité à effectuer de la captation sélective.

1.2.2 Le SR-BI

1.2.2.1 La structure de SR-BI et ses lieux d'expression

Le SR-BI a été identifié par l'équipe de Krieger en tant que récepteur qui lie les LDL acétylées (LDLac), les LDLox et les LDL natives (Acton *et al.* 1994). Plus tard, il fut démontré que les HDL (Acton *et al.* 1996), les VLDL (Calvo *et al.* 1997) et les LDL (Rhainds *et al.* 1999) sont des ligands de SR-BI. Le SR-BI est une glycoprotéine de 509 acides aminés avec un poids moléculaire de 85 kDa qui possède 2 domaines cytoplasmiques C- et N-terminaux séparés par un grand domaine extracellulaire (Van Eck *et al.* 2005) (figure 1.3). Le domaine extracellulaire contient 9 sites putatifs de N-glycosylation et 6 cystéines. Le SR-BI est soit palmitoylé ou myristoylé sur 2 cystéines localisées dans la queue C-terminale (Babitt *et al.* 1997 ; Gu *et al.* 1998). Il est surtout exprimé au niveau hépatique ainsi que dans les tissus stéroïdogènes tels les ovaires, les testicules et les glandes surrénales. Les SR-BI se trouvent dans des microdomaines appelés cavéoles dans la membrane plasmique (Babitt *et al.* 1997; Fielding & Fielding, 1995 ; Graf *et al.* 1999). La cavéoline-1, une protéine signature des cavéoles, joue un rôle dans le transport du cholestérol et elle est également impliquée dans l'efflux du cholestérol via le SR-BI (Frank *et al.* 2002 ; Wang *et al.* 2003). L'expression de SR-BI induit la formation des structures spécialisées appelées canaux de microvillosité dans les cellules en culture et dans les tissus stéroïdogènes *in vivo* (Reaven *et al.* 2001 ; Williams *et al.* 2002). Ces structures semblent être les sites de captation sélective par le SR-BI dans ces cellules.

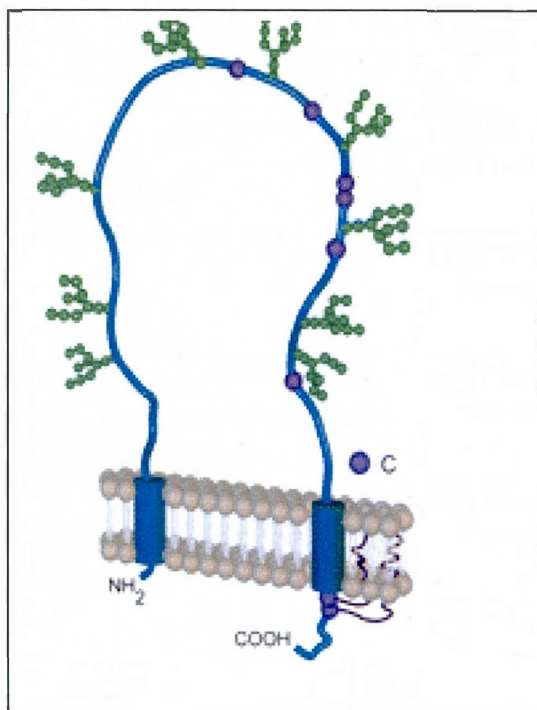


Figure 1.3 : Structure du SR-BI

Schéma représentatif de la structure de la protéine SR-BI chez les humains. La protéine SR-BI humaine est une protéine membranaire contenant 2 domaines transmembranaires séparés par un large domaine extracellulaire. Tiré de Cocquerel *et al.* (2006).

1.2.2.2 La voie du SR-BI et sa régulation

Il fut démontré en 1996 que le SR-BI captait sélectivement les EC de HDL (Acton *et al.* 1996). Le phénomène de la captation sélective désigne un processus par lequel les EC des lipoprotéines pénètrent à l'intérieur de la cellule (Williams *et al.* 1999), laissant des lipoprotéines appauvries en EC dans la circulation. La rétroendocytose serait responsable de ce mécanisme chez les souris (Silver & Tall, 2001), les rats

(DeLamatre *et al.* 1990) et les humains (Kambouris *et al.* 1990). Au niveau cellulaire la rétroendocytose a été démontrée pour les hépatocytes, les macrophages (Schmitz *et al.* 1985) et les cellules intestinales CaCo-2 (Rogler *et al.* 1992). Elle a été démontrée également dans notre laboratoire au niveau des cellules HepG2 (Rhainds *et al.* 2004).

Pendant plusieurs années, la voie de la captation sélective était attribuée uniquement aux HDL. En 1996, le groupe de Madame Brissette a démontré qu'un récepteur dans les cellules HepG2 pouvait effectuer la captation sélective des EC des LDL, et qu'il y avait cinq fois plus d'entrée des esters de cholestérol par cette voie (captation sélective), que par celle du rLDL (captation globale) (Brissette *et al.* 1996). En 2003, l'équipe de Madame Brissette a aussi démontré l'implication de SR-BI dans la captation sélective des EC des LDL par les cellules HepG2 et les hépatocytes de souris en comparant la captation sélective des hépatocytes de souris sauvages et knockout (KO) en SR-BI (Rhainds *et al.* 2003). En 2005, l'implication de SR-BI dans la captation sélective des EC des LDL fut démontrée *in vivo* chez la souris (Brodeur *et al.* 2005).

Notons aussi que l'enrichissement des HDL en TG diminue la captation sélective en EC alors que la réduction des taux de TG avec la LPL augmente la captation sélective des EC (Greene *et al.* 2001). De plus, le SR-BI est responsable d'échanges bidirectionnels de lipides, puisqu'il est en partie responsable de l'efflux de CL cellulaire vers les lipoprotéines (Ji *et al.* 1997). Des études ont montré chez les souris SR-BI KO, un taux élevé de cholestérol plasmatique associé principalement à une accumulation d'EC dans les HDL, et une plus grande susceptibilité à l'athérosclérose (Braun *et al.* 2002 ; Rigotti *et al.* 1997). Les effets proathérogènes de la déficience en SR-BI ont été principalement attribués aux perturbations du flux de cholestérol par la voie du transport inverse du cholestérol. Cependant, si les variations de la fonction de SR-BI chez l'Homme sont en effet associées à une susceptibilité à l'athérosclérose, cela va établir l'importance du SR-BI comme cible thérapeutique afin de réduire les

risques liés aux maladies cardiovasculaires. Mais, une étude plus récente a démontré qu'une déficience en SR-BI augmente les niveaux de cholestérol HDL, diminue l'efflux de cholestérol en provenance des macrophages et n'a aucune augmentation significative dans l'athérosclérose (Vergeer *et al.* 2011).

L'expression du SR-BI hépatique peut être régulée par une variété de changements hormonaux, métaboliques, pharmacologiques et alimentaires (Rigotti *et al.* 2003; Trigatti *et al.* 2000). Au niveau du foie, un domaine d'interaction avec PDZK1 (appelé également CLAMP) a été identifié sur le SR-BI qui favorise sa localisation de SR-BI à la surface cellulaire, suggérant un rôle important de PDZK1 dans l'activité de SR-BI (Ikemoto *et al.* 2000 ; Kocher *et al.* 2003).

1.3 La problématique

En 2005, l'implication de SR-BI envers les LDL fut démontrée *in vivo* chez la souris par le groupe de Madame Brissette (Brodeur *et al.* 2005). Pour ce faire, des souris ont été injectées avec des LDL marquées radio-activement en protéines ou en EC et la clairance des deux a été mesurée dans le sang. Ainsi, il fut démontré que les EC des LDL disparaissent beaucoup plus rapidement que leurs protéines révélant que la captation sélective des EC-LDL se produit *in vivo* avant que la LDL soit captée pour une dégradation totale par la voie du rLDL. De plus, cette même étude a démontré que les ¹²⁵I-LDL injectées puis récupérées de la circulation de la souris, 3 heures plus tard, sont plus petites et que leurs charges sont différentes des ¹²⁵I-LDL de départ. Si celles-ci correspondent aux LDL petites et denses, également connues sous le nom de LDL₃, donc la captation des EC des LDL par le SR-BI n'est pas favorable parce que ces LDL sont plus sensibles à l'oxydation et les LDLox sont positivement associées aux maladies cardiovasculaires. Alternativement, comme la clairance accélérée des protéines-LDL a été montrée chez les souris transgéniques sur-exprimant le SR-BI (Ueda *et al.* 1999), il est également possible que ces plus petites LDL soient de

meilleurs ligands pour le rLDL. La perte des EC pourrait également accroître le transfert des EC des HDL par la CETP pour la captation ultérieure de LDL par le rLDL dans le foie, ce qui favoriserait le transport inverse du cholestérol et serait favorable à l'organisme. Aussi, l'étude effectuée par Brodeur en 2005 montrait le comportement des LDL humaines en général qui regroupent les LDL₁, LDL₂ et LDL₃ après la captation sélective des EC par le SR-BI, mais il n'y a aucune étude qui montre l'impact de la captation sélective des EC des LDL₁, LDL₂ et LDL₃ individuellement par le SR-BI. Ceci a fait l'objet de mon étude. Les résultats obtenus vont permettre de déterminer les effets de la captation sélective par SR-BI sur la composition chimique, la physiologie et les voies métaboliques de ces trois sous-classes de LDL.

1.4 Les hypothèses

L'hypothèse centrale stipulait que les effets de la captation sélective des EC ne seront pas identiques pour les sous-classes de LDL puisqu'elles ont des compositions initiales en EC différentes.

Notre première hypothèse était que les LDL₁, LDL₂ et LDL₃ obtenues après la captation sélective de leurs EC par l'activité de SR-BI seront toutes plus denses, car moins les LDL ont de TG et d'EC, plus elles sont denses et moins elles ont du volume.

Notre seconde hypothèse était que ces LDL₁, LDL₂ et LDL₃ appauvries en EC auront plus d'affinité pour le rLDL car les études *in vivo* réalisées par Ueda *et al.* (1999) montrent qu'il y a une accélération de la clairance des LDL humaines chez les souris sur-exprimant le SR-BI comparativement aux souris exprimant un faible taux de SR-BI.

La troisième hypothèse était que les LDL₁, LDL₂ et LDL₃ appauvries en EC ont une plus grande capacité d'accepter les EC des HDL grâce à l'action de la CETP que ces mêmes sous-classes de LDL natives.

La quatrième hypothèse était que les LDL₁, LDL₂ et LDL₃ qui sont partiellement appauvries en EC sont moins sensibles à l'oxydation que ces mêmes sous-classes de LDL natives qui sont plus riches en EC et dont les chaînes d'acides gras insaturés sont appelées à être oxydées.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel

Le sérum humain a été obtenu de Bioreclamation Inc. (Westbury, New York, USA). Les souris CD1 ont été achetées chez Charles River (Saint-Constant, Canada). Les systèmes commerciaux de dosage de CL et de CT ont été acquis de Wako Chemicals (Richmond, Virginia, USA). Le tampon barbital et le système commercial de dosage de TG ont été obtenus de Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA). Les cellules HepG2 ont été achetées chez American Type Culture Collection (Manassas, Virginie, USA). L'iode-125 et le 1, 2- ^3H -cholestérol oléate ont été obtenus de PerkinElmer Health Sciences Canada Inc. (Woodbridge, Ontario, Canada).

2.2 Méthodes

D'après l'étude de Brodeur *et al.* (2005) provenant de notre laboratoire, des LDL provenant du sang humain (1 mg) de spectre global de densité (1,025-1,063 g/ml) injectées dans les souris deviennent 3 heures plus tard appauvries en EC, sont de plus petites tailles et démontrent également un changement dans leurs charges par rapport aux LDL non injectées. Mon étude a porté sur l'analyse de l'appauvrissement en EC des 3 sous-classes de LDL (LDL₁, LDL₂, LDL₃ de densités 1,020-1,034, 1,034-1,044 et 1,044-1,063 g/ml, respectivement). Ces sous-classes ont été obtenues par centrifugation à différentes densités de plasma humain et elles ont été identifiées LDL₁, LDL₂ et LDL₃ natives. Pour obtenir des LDL₁, LDL₂ et LDL₃

appauvries en EC par l'action du SR-BI, 3 mg de LDL₁, LDL₂ ou LDL₃ humaines ont été injectées dans la veine caudale de souris CD1, le sang a été prélevé par ponction cardiaque 5 heures plus tard et les différentes préparations de LDL ont été isolées par ultracentrifugation. Les LDL récupérées ont été dès lors identifiées comme LDL modifiées. Nous avons eu toutefois un manque de matériel à injecter pour les LDL₃ (peu de LDL₃ dans le sérum humain) et ceci ne nous a pas permis de tester ces LDL₃ sur les cellules HepG2. Cette quantité de 3 mg à injecter était 42 fois plus élevée que celle des LDL endogènes dans le plasma de souris, ainsi, les échantillons ont été peu contaminés par les LDL murines. La quantité de LDL modifiées nécessaire pour réaliser toutes les études requises à partir de chacune des préparations de LDL étant de l'ordre de 6-8 mg, plusieurs souris ont dû être injectées afin de faire face à la perte de matériel engendrée par l'impossibilité de retirer tout le sang des souris injectées et de l'ultracentrifugation. Ainsi, 10 souris ont été injectées par préparation de sous-classe de LDL et les LDL modifiées ont été isolées par ultracentrifugation. Évidemment, chacune de ces préparations ont été faites trois fois afin de nous assurer de pouvoir analyser les résultats statistiquement (le nombre total est de 90 souris). Par la suite, chacun des types de LDL, soit les LDL₁, LDL₂ et LDL₃ natives et modifiées ont été caractérisés pour leurs :

- Compositions en TG, CL et EC;
- Tailles par électrophorèse sur gradient de gel de polyacrylamide;
- Densités par la méthode de Terpstra;
- Charges par électrophorèse sur gel d'agarose-barbital;
- Sensibilités inhérentes à l'oxydation par l'incubation des échantillons LDL avec du CuSO₄;
- Capacités à accepter les EC des HDL par la CETP;
- Affinités de liaison pour le rLDL des cellules HepG2 dans les conditions de saturation de SR-BI par les HDL₃, ce qui permet la liaison des LDL exclusivement aux rLDL. La dégradation a été également estimée comme un

indicateur de l'activité de rLDL. Pour ceci, les différents types de LDL ont été marqués à l'iode-125. Aussi, la captation sélective a été évaluée à partir de l'activité de SR-BI des cellules HepG2. Pour ceci, des LDL marquées à l'iode-125 et aux EC tritiés ont été utilisées.

2.2.1 L'isolement des lipoprotéines

Les lipoprotéines ont été isolées du sérum humain par ultracentrifugation à 16°C suivant la méthode de Hatch & Lees (1968). Préalablement, le plasma a été ajusté à 0,01% de tétracétate d'éthylènediamine (EDTA), 10 μ M de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) et 0,02% de NaN_3 pour empêcher toute contamination bactérienne. La densité a été ajustée par l'ajout du bromure de sodium. Pour obtenir une fraction totale de LDL (densité : 1,025-1,063 g/ml), le plasma ajusté à 1,025 g/ml a été centrifugé à 2 300 000 g x h. Le sous-nageant récupéré a été ajusté ensuite à 1,063 g/ml puis centrifugé selon les mêmes conditions précédentes et les LDL ont été récupérées en haut du tube. Pour obtenir des sous-fractions de LDL, on a procédé de la même façon à l'exception que les densités étaient de 1,020-1,034, 1,034-1,044 et 1,044-1,063 g/ml, pour les LDL₁, LDL₂ et LDL₃, respectivement. Pour isoler des HDL₃, le plasma a été ajusté à 1,125 g/ml puis centrifugé à 3 000 000 g x h. Le sous-nageant a été par la suite réajusté à 1,21 g/ml et centrifugé à 4 600 000 g x h. Les HDL₃ de densité 1,125-1,21 g/ml ont été récoltées dans la partie supérieure du tube. Les fractions des lipoprotéines obtenues ont été dialysées dans une solution de 150 mM de NaCl contenant 1% d'EDTA à pH 7,4 afin de remettre la solution à la densité initiale du plasma.

2.2.2 Les différentes caractéristiques des LDL

2.2.2.1 La composition en triglycérides, cholestérol et esters de cholestérol

Les concentrations de cholestérol total, de cholestérol libre et de triglycérides ont été mesurées avec des tests commerciaux (Wako, Richmond, Va) basés sur des essais enzymatiques colorimétriques. La concentration en EC a été évaluée par la soustraction du cholestérol libre au cholestérol total (Liand & Vaziri, 2002).

2.2.2.1.1 La mesure des taux de triglycérides

Les taux de triglycérides ont été mesurés dans chacune des LDL natives et modifiées. Brièvement, 0,8 ml du réactif A Triglycérides (GPO-Trinder) a été mélangé à chaque échantillon (50 µg) et à 10 µl du standard (glycérol) et du blanc en les retournant délicatement. La solution a été par la suite incubée pendant 5 minutes à la température de la pièce. Une première lecture a été réalisée à 540 nm contre l'eau, du blanc, du standard et des échantillons. Le réactif B Triglycérides (GPO-Trinder) (0,2 ml) a été ajouté dans chaque tube, a été mélangé puis incubé à 37°C pendant 10 minutes. La lecture finale a été réalisée également à 540 nm.

2.2.2.1.2 La mesure des taux de cholestérol total et libre

Pour mesurer le taux du cholestérol total, 1 ml du réactif colorimétrique a été ajouté à l'échantillon (35 µg en terme protéique) et à 10 µl de chacun du standard et du blanc. La solution a été incubée pendant 15 minutes à 37°C puis la lecture a été réalisée à 600 nm dans le spectrophotomètre. Concernant le cholestérol libre, 50 µg d'échantillon ont été déposés dans un tube (volume final 25 µl) et le réactif (1,5 ml) a été ajouté pour chaque échantillon, standard et blanc. La solution a été incubée par la suite à 37°C pendant 5 minutes et l'absorbance a été déterminée à 600 nm.

2.2.2.2 L'évaluation de la taille par électrophorèse sur gradient de gel de polyacrylamide (NDGGE)

Une approche similaire à celle de Krauss & Burke (1982) a été utilisée pour évaluer les dimensions des particules de LDL. Dix µg d'échantillon ont été mélangés avec 5 µl de sucrose à 40% dans un tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) (0,09 M Tris, 0,08 M borate et 0,003 M EDTA à pH 8,3). Dix µl ont été chargés sur un gradient de gel de polyacrylamide non dénaturant de 2-16%. L'électrophorèse a été réalisée à 4°C en utilisant un voltage de 25 V pendant 15 minutes, 70 V pour 20 minutes et 125 V pour 24 heures. Le gel a été coloré avec le bleu de Coomassie R-250 pendant 10 minutes dans une solution de 17% d'acide acétique et de 42% de méthanol puis décoloré avec plusieurs lavages de 15 minutes dans une solution de 9% d'acide acétique et de 20% de méthanol. Le gel a été par la suite photographié.

2.2.2.3 L'évaluation de la densité par la procédure de Terpstra

Cette méthode est particulièrement utilisée pour isoler les lipoprotéines ou les sous-fractions des lipoprotéines (Terpstra *et al.* 1981) à différentes densités par ultracentrifugation en gradient de densité. En apportant une modification à la méthode décrite par Narayan (1975), la solution de noir soudan a été préparée en rajoutant 0,1 g de noir Soudan à 100 ml d'éthylène glycol à une température de 65°C, le tout a été vigoureusement mélangé pendant 2 minutes puis filtré. Des tubes en « polyallomère » de 3 ml ont été utilisés, contenant 57×10^{-3} g de NaBr et $12,5 \times 10^{-3}$ g de sucrose auxquels ont été rajoutés 0,5 ml d'échantillon et 0,05 ml de noir Soudan. Les composants ont été mélangés à l'aide d'une spatule (densité finale de 1,10 g/ml). Ensuite, ont été rajoutés successivement, 1,2 ml de la solution saline à une densité de 1,06 g/ml puis 1,2 ml de H₂O. Les tubes ont été centrifugés à 100 000 g, à 20°C, pendant 7 heures et le gradient de densité a été photographié. Les différentes classes

de lipoprotéines peuvent être observées par des bandes distinctes grâce au gradient de densité qui s'était formé.

2.2.2.4 L'évaluation de la charge par gel d'agarose barbital

Le gel d'agarose barbital permet de séparer les lipoprotéines en fonction de la charge négative des protéines exposées à la surface des particules. L'électrophorèse des lipoprotéines a été réalisée avec un gel d'agarose à 0,75%. Le tampon barbital utilisé (Sigma) était 4 fois concentré, il était dilué 4 fois pour le tampon de migration. Le tampon de chargement contenait 20% (v/v) de glycérol, 80% (v/v) de tampon barbital 4 fois concentré et 0,25% (p/v) de bleu de bromophénol. Le volume total était de 24 μ l contenant 5 μ g d'échantillon et 7,5 μ l de tampon de chargement. La migration a été réalisée à 4°C pour une durée de 90 minutes à 90 V. Le gel a été coloré dans une solution de bleu de Coomassie R-250 pendant 5 à 10 minutes puis décoloré avec des lavages successifs de 15 minutes avec une solution décolorante comme décrite précédemment.

2.2.2.5 La sensibilité inhérente à l'oxydation par l'incubation des échantillons de LDL avec du CuSO_4

L'oxydation des LDL (50 μ g/ml dans du PBS) a été réalisée en ajoutant 1,6 μ mol/l de CuSO_4 . Les différentes sous-classes de LDL natives et modifiées ont été déposées dans une plaque de quartz et incubées à 37°C dans un spectrophotomètre. La lecture a été réalisée à chaque 4 minutes pendant 5 heures à une longueur d'onde de 234 nm afin de suivre la formation des diènes conjugués après l'addition du CuSO_4 (Maggi *et al.* 1994). La courbe d'oxydation obtenue est caractérisée par 3 paramètres. La phase de latence, qui est exprimée en minutes, est l'intervalle entre l'ajout du CuSO_4 et le début de l'oxydation. Elle est mesurée par l'interception de la tangente de la phase d'oxydation et l'axe du temps. Cette phase correspond à la consommation progressive

des antioxydants présents dans la lipoprotéine. Le taux de propagation (exprimé en des changements d'absorbance par minute) est le taux maximal de production de diènes conjugués détectés dans la courbe cinétique. Le seuil de saturation (exprimé en minutes) est l'intervalle entre l'ajout du CuSO_4 et le temps auquel le maximum d'absorbance à 234 nm est atteint.

2.2.2.6 La capacité des LDL à accepter les EC des HDL₃ par la CETP

C'est par la méthode de Guérin *et al.* (1994) adaptée à nos besoins que le transfert des EC des HDL₃ vers les LDL a été quantifié. Donc des HDL₃ ont été marquées avec du ^3H -cholestérol oléate selon la méthode de Roberts *et al.* (1985). Ainsi, 25 μCi de ^3H -cholestérol oléate ont été évaporés sous un léger jet d'azote pour 45 minutes et dissout dans 250 μl d'acétone. La préparation a été ajoutée goutte à goutte à 3 ml de sérum dépourvu en lipoprotéines puis laissée à la température ambiante. Un mg/ml de HDL₃ a été ajouté au sérum dépourvu en lipoprotéines qui contient l'EC radioactif. Le tout a été ensuite incubé à 4°C pendant 30 minutes et les HDL₃ maintenant marquées radioactivement ont été ré-isolées par ultracentrifugation. Pour mesurer le transfert, les différents types de LDL (20 μg) ont été mis séparément en contact avec 10 μg de ^3H -CE-HDL₃ pendant 5 heures à 37°C dans du sérum déficient en lipoprotéines qui contient de façon endogène de la CETP. Une fois l'incubation terminée, les échantillons ont été déposés sur glace pour arrêter la réaction. Afin de mettre en évidence les différentes fractions des lipoprotéines incubées au préalable, ces dernières ont été isolées par la méthode de Terpstra *et al.* (1981) et la radioactivité a été déterminée dans la phase inférieure (HDL₃) et supérieure (LDL) dans le compteur β (Wallach, Fischer).

2.2.2.7 Les essais de liaison, d'association et de dégradation des lipoprotéines

Les essais de liaison et de dégradation nécessitent que les différents types de LDL natives ou appauvries en EC dans la souris, c'est-à-dire modifiées, soient marqués à l'iode-125 dans leur partie protéique par la méthode de Mc Farlane (1958) modifiée par Langer *et al.* (1972). Ainsi, 1 mCi de Na¹²⁵I a servi à marquer 2,5 mg de LDL en présence d'une solution de 30 nM de monochlorure d'iode et de 0,5 M de glycine-NaOH à pH 10. Pour éliminer l'iode-125 non incorporé, la préparation a été soumise à une chromatographie sur gel de Sephadex G-25 et ensuite dialysée dans une solution de tampon tris salin (TBS). Les différents types de ¹²⁵I-LDL se devaient d'être testés pour leur habilité à interagir avec les récepteurs des cellules HepG2. Ces cellules HepG2 ont été maintenues en culture dans des flacons de 75 cm² contenant 15 ml de milieu minimum essentiel (MEM) (Life Technologies Gibco BRL) auquel a été rajouté 10 % du sérum fœtal bovin (FBS) (Life Technologies Gibco BRL), 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine (Life Technologies Gibco BRL) et 4 mM de glutamine. Cinq jours avant les tests de liaison et de dégradation, 3,0 x 10⁵ de cellules ont étéensemencées dans des boîtes de culture de 3,8 cm² (plaque de 12 puits). Le milieu de culture a été changé chaque deux jours. La culture a été réalisée en atmosphère saturée en eau et avec 5% de CO₂, à 37°C. Enfin, les cellules ont été utilisées quand le degré de confluence atteint 80-90%.

2.2.2.7.1 Les essais de liaison

Le principe des études de liaison visant à évaluer l'affinité d'un ligand pour son récepteur est de mesurer la liaison spécifique à l'équilibre, donc à 4°C, lors de l'incubation de concentrations croissantes de ligand radioactif avec une quantité fixe de récepteur, donc de cellules. Pour les essais de liaison, comme décrit par Brissette *et al.* (1996), les cellules HepG2 ont été lavées 2 fois avec 1 ml de PBS (tampon salin

phosphate) puis elles ont été incubées pendant 2 heures à 4°C avec 1 à 35 µg de protéines/ml de ^{125}I -LDL dans un volume total de 250 µl de MEM, 4% BSA (albumine de sérum bovin) et 50 mM HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) à pH 7,4 (liaison totale). Les mesures ont été effectuées sur des cellules qui ont été incubées avec 1,5 mg/ml de HDL₃, une quantité qui permet la saturation de SR-BI. Ainsi les LDL ne peuvent se fixer à ce récepteur et se lient exclusivement au rLDL. Les liaisons non spécifiques ont été déterminées par l'ajout de 1,5 mg de LDL non marquées/ml. À la fin de la période d'incubation, les monocouches de cellules ont été lavées deux fois avec du PBS (1 ml) contenant 0,2% de BSA (PBS-BSA) suivies de deux lavages avec 1 ml de PBS. Les cellules ont été ensuite solubilisées dans 1,5 ml de NaOH à 0,1 M. La radioactivité γ a été mesurée (compteur Cobra II, Canberra-Packard). La liaison spécifique a été calculée par la soustraction de la valeur de liaison non spécifique à la valeur totale de liaison. Des courbes ont été générées par les données spécifiques de liaison en fonction de la concentration de ^{125}I -LDL ajoutées dans les puits des cellules HepG2. Ces mêmes données ont été transformées en ratio suivant : ^{125}I -LDL liées aux cellules (µg de protéines de LDL/mg de protéines cellulaires)/ ^{125}I -LDL libres (µg de protéines/ml). Ces données de ratio ont servi à créer un graphique de Scatchard en fonction de la quantité de ^{125}I -LDL liées spécifiquement (µg de protéines/mg de protéines cellulaires) (logiciel GraphPad Prism version 5). La représentation de Scatchard a permis de déterminer le Kd (constante de dissociation à l'équilibre) et le Bmax (capacité maximale de liaison). Le Kd a été calculé à partir de la pente (égale à moins l'inverse de la pente) et le Bmax a été déterminé par le point d'interception de la droite avec l'abscisse.

2.2.2.7.2 Les essais de dégradation

Les essais de dégradation révèlent uniquement l'activité du rLDL envers les LDL puisque que le SR-BI n'entraîne pas la dégradation des LDL. Une fois que les LDL sont internalisées par la voie du rLDL et se trouvent dans les lysosomes, ses constituants protéiques sont dégradés en acides aminés et peptides. Or un peptide portant un groupe iodé est rejeté par la cellule, ce qui en fait, dans le milieu d'incubation, un indicateur de l'activité de dégradation lié au rLDL (Brown *et al.* 1975 ; Goldstein & Brown, 1974). Ces essais se font comme les essais de liaison mais à 37°C pendant 4 heures et sans HEPES ni HDL₃. La dégradation des protéines de ¹²⁵I-LDL a été estimée à partir du milieu. Le milieu de culture a été récolté dans un tube, ensuite les puits cellulaires ont été lavés avec du PBS-BSA à 0,2% qui est ajouté au milieu récupéré. Dans le tube ont été ensuite rajoutés 50 µl de BSA à 10% et 500 µl de TCA (Acide trichloracétique) à 24%. Essentiellement, le TCA a été ajouté au milieu dans les tubes à centrifuger pour permettre la précipitation des protéines. La solution a été incubée pendant un minimum de 30 minutes à 4°C puis centrifugée pendant 10 minutes à 4 000 rpm. Afin d'éliminer l'iode libre et estimer la dégradation dans les cellules, 10 µl de KI à 40% et 40 µl de H₂O₂ à 30% ont été rajoutés au surnageant récupéré. La solution a été incubée pendant 5 minutes à la température de la pièce puis une extraction a été réalisée avec 2 ml de CHCl₃. La phase supérieure (phase aqueuse) qui correspond à des peptides de ¹²⁵I-LDL a été récupérée puis mesurée dans le compteur γ. Les monocouches de cellules ont été lavées deux fois avec 1 ml de PBS contenant 0,2% de BSA (PBS-BSA) suivies de deux lavages avec 1 ml de PBS. Les cellules ont été ensuite solubilisées dans 1,5 ml de NaOH à 0,1 M afin d'évaluer la quantité de protéines cellulaires.

2.2.2.7.3 Les essais d'association

Les essais d'association ont été réalisés de la même façon que les essais de dégradation, sauf que dans ce cas, des ^3H -CE-LDL ont été aussi utilisées pour suivre exclusivement la partie lipidique des LDL. Pour y arriver, l'activité spécifique des ^{125}I -LDL et des ^3H -CE-LDL a été évaluée en cpm/ μg de protéines et les essais ont été réalisés en parallèle. Les LDL ont été marquées de la même façon que les HDL₃ avec des ^3H -EC tel que décrit ci-haut par la méthode de Roberts *et al.* (1985). La captation sélective a été calculée par la soustraction de la somme des valeurs de l'association protéique et de la dégradation (estimées toutes deux lorsque les cellules étaient incubées avec des ^{125}I -LDL) des valeurs de l'association lipidique (estimées grâce aux ^3H -CE-LDL). Chaque valeur supérieure à zéro indique qu'il y a de la captation sélective. La radioactivité a été mesurée par le compteur γ pour le ^{125}I et β pour le ^3H -EC.

2.3 Autres méthodes

La concentration des protéines des différents milieux a été déterminée par la méthode de Lowry (Lowry *et al.* 1951) avec la BSA comme standard. L'analyse statistique a été obtenue par l'analyse des t tests (et les tests non paramétriques) du logiciel GraphPad Prism version 5. Des différences sont considérées significatives à $p < 0,05$.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

Les LDL peuvent être subdivisées selon leur densité. Ainsi, dans l'ordre de densité croissante, il y a les LDL₁, LDL₂ et les LDL₃. Ces LDL identifiées LDL natives ont été injectées séparément à des souris CD1. Le sang a été récupéré par ponction cardiaque 5 heures plus tard afin de nous permettre d'évaluer les différents changements que peuvent subir ces différentes sous-classes de LDL après la captation sélective de leurs EC par le SR-BI. Ces dernières ont été identifiées comme des LDL modifiées. Cette section traitera de la caractérisation biochimique et métabolique de ces LDL natives et modifiées.

3.1 La composition en triglycérides, cholestérol et esters de cholestérol des différentes sous-classes de LDL natives et modifiées

3.1.1 Les triglycérides

La figure 3.1 montre que les LDL₂ ont 30% moins de TG et les LDL₃ en ont 40% moins que les LDL₁. Les résultats montrent également que les LDL₁ modifiées ont une diminution de 58% en TG par rapport aux LDL₁ natives. Une diminution significative en TG de 41% est observée également chez les LDL₂ modifiées comparativement à leur forme native. Par contre, il n'y a aucune différence significative en TG constatée entre les LDL₃ natives et modifiées.

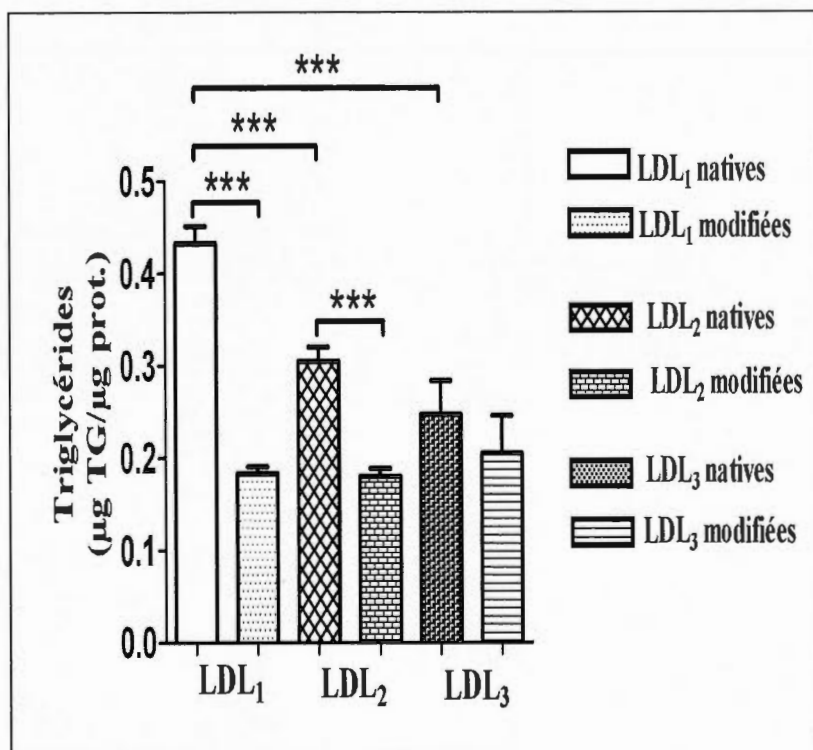


Figure 3.1: Composition en triglycérides des sous-classes de LDL natives et modifiées. Les taux de TG ont été mesurés tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. Les valeurs sont des moyennes \pm S.E.M ($n=4$) et chaque essai a été fait en duplicata. L'analyse statistique a été faite avec le test t de Student. *** $p < 0,0001$.

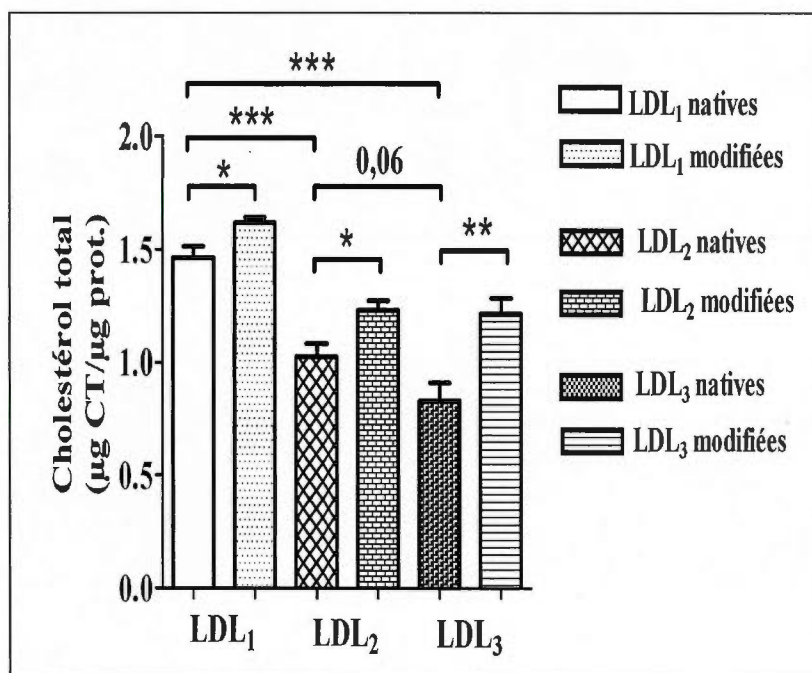
3.1.2 Le cholestérol total, cholestérol libre et esters de cholestérol

Les résultats de la figure 3.2 A montrent que les LDL₂ natives ont 30% moins de cholestérol total et les LDL₃ natives ont en 43% moins que les LDL₁ natives. Une tendance à la diminution ($p=0,06$) est observée entre les LDL₂ natives et les LDL₃ natives (diminution de 19% en cholestérol total pour les LDL₃ natives par rapport aux LDL₂ natives). Le phénomène inverse est observé entre les différentes sous-classes de LDL natives et modifiées c'est-à-dire que toutes les LDL₁, LDL₂ et LDL₃ modifiées ont un enrichissement en cholestérol total de 11%, 20% et 46%, respectivement par rapport à leurs formes natives.

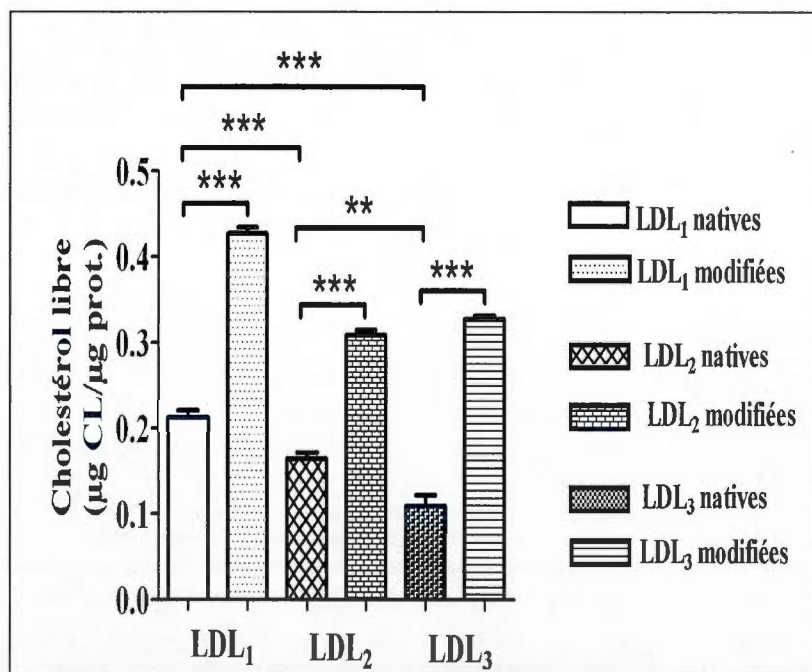
La figure 3.2 B montre que les taux en cholestérol libre diminuent lorsque la densité des LDL augmente. Cette diminution est de l'ordre de 22% pour les LDL₂ natives et de 49% pour les LDL₃ natives par rapport à la sous-classe de LDL₁ natives. Une diminution de 34% est également constatée au niveau de la sous-classe de LDL₃ natives par rapport à la composition en cholestérol libre des LDL₂ natives. Les résultats montrent également qu'il y a des niveaux plus importants de cholestérol libre dans chacune des LDL₁, LDL₂ et LDL₃ modifiées par rapport à leurs formes natives. Ainsi, chacune des LDL₁ et LDL₂ et LDL₃ modifiées ont eu un enrichissement en cholestérol libre de 1,9, 2,2 et 2,7 fois la quantité des LDL₁ et LDL₂ et LDL₃ natives.

La figure 3.2 C montre qu'il y a significativement 22% moins d'EC dans les LDL₂ natives, 41% moins dans les LDL₃ natives comparativement à la composition en EC des LDL₁ natives et de 25% moins dans les LDL₃ natives par rapport à la composition des LDL₂ natives. Les résultats montrent également qu'il n'y a une diminution significative de 15% en EC pour les LDL₁ modifiées par rapport à leurs formes natives. Toutefois, il n'y a aucune différence significative observée au niveau des taux d'EC entre les sous-classes de LDL₂ et LDL₃ natives et modifiées.

A.



B.



C.

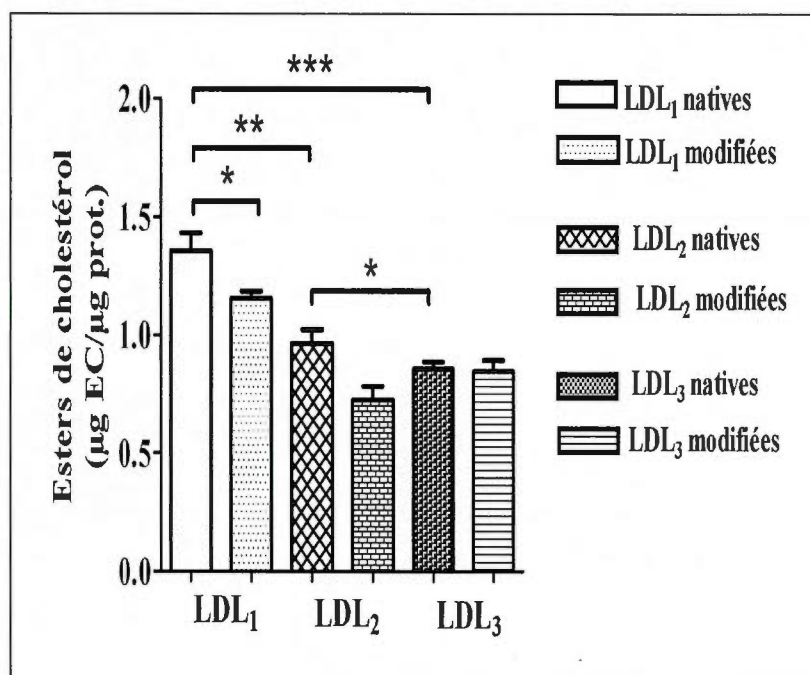


Figure 3.2 : Composition en cholestérol total, libre et esters de cholestérol des sous-classes de LDL natives et modifiées. Les taux de cholestérol total, libre et estérifié ont été mesurés tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. **A:** Cholestérol total des sous-classes de LDL natives et modifiées. **B:** Cholestérol libre des sous-classes de LDL natives et modifiées. **C:** Esters de cholestérol des sous-classes de LDL natives et modifiées. Les valeurs sont des moyennes \pm S.E.M ($n=4$) pour le cholestérol total, libre et les esters de cholestérol et chaque essai a été fait en duplicata. L'analyse statistique a été faite avec le test t de Student. * $p < 0,05$. ** $p < 0,005$. *** $p < 0,0001$.

3.2 La taille des différentes sous-classes de LDL

Les différentes LDL ont subi une électrophorèse non dénaturante sur un gel de polyacrylamide de 2-16% afin de déterminer la taille de chacune. Les résultats de la figure 3.3 montrent que les LDL₃ natives (position 5) sont de plus petites tailles que les LDL₂ natives (position 3) qui sont à leur tour plus petites que les LDL₁ natives (position 1) en accord avec la littérature (Berneis & Krauss, 2002 ; Campos *et al.* 1996) spécifiant que plus les LDL sont denses, plus elles sont petites. Cette même figure montre également que les LDL₁ et LDL₃ modifiées migrent différemment que leurs homologues natives. Ainsi, les LDL₁ modifiées qui sont illustrées en position 2 migrent légèrement plus loin dans le gel NDGGE signifiant que ces LDL₁ modifiées sont de plus petites tailles comparativement aux LDL₁ natives. Tant qu'à elles, les LDL₃ modifiées migrent moins loin dans le gel et sont donc de plus grosse taille que celle de leur forme native.

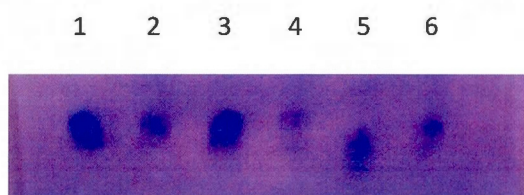


Figure 3.3 : Taille des différentes sous-classes de LDL ayant subies ou non de la captation sélective *in vivo*. Les échantillons (2 µg) ont été chargés sur un gel de polyacrylamide non dénaturant de 2-16% (NDGGE) tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. **1:** LDL₁ natives. **2:** LDL₁ modifiées. **3:** LDL₂ natives. **4:** LDL₂ modifiées. **5:** LDL₃ natives. **6:** LDL₃ modifiées. Les expériences ont été réalisées à 4 reprises et chaque essai a été fait en duplicata.

3.3 La charge des différentes sous-classes de LDL

Les différentes préparations de LDL ont été déposées sur un gel d'agarose/barbital 0,75% afin de les séparer en fonction de leur charge. Plus les LDL migrent dans le gel, plus elles sont chargées négativement. La figure 3.4 montre qu'il y a peu de différence de charge entre les LDL₁, LDL₂ et LDL₃ natives (position 1, 3 et 5, respectivement). Cette même figure montre que les LDL₁ modifiées et les LDL₃ modifiées (position 2 et 6) migrent plus loin dans le gel par rapport à leurs homologues natives. Par contre, les LDL₂ modifiées migrent moins loin dans le gel par rapport aux LDL₂ natives, ce qui signifie qu'elles sont moins chargées négativement.

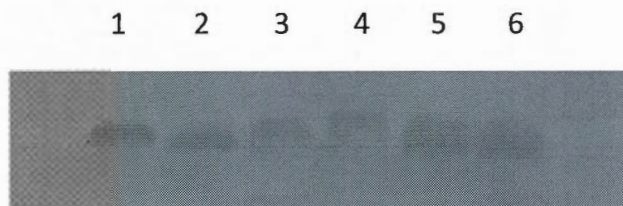


Figure 3.4 : Charge électrique des différentes sous-classes de LDL ayant subies ou non de la captation sélective *in vivo*. Cinq μg de chaque type de LDL ont été déposés sur un gel d'agarose/barbital à 0,75% tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. **1:** LDL₁ natives. **2:** LDL₁ modifiées. **3:** LDL₂ natives. **4:** LDL₂ modifiées. **5:** LDL₃ natives. **6:** LDL₃ modifiées. Les expériences ont été réalisées à 4 reprises et chaque essai a été fait en duplicata.

3.4 La densité des différentes sous-classes de LDL

La densité des différentes préparations de LDL a été évaluée par ultracentrifugation sur gradient de densité. Premièrement, la figure 3.5 révèle, tel qu'attendu, que les LDL₁ sont moins denses que les LDL₂ et que ces dernières sont moins denses que les LDL₃ (voir position 1, 3 et 5). De plus, la figure montre que la bande correspondant aux LDL₁ modifiées (position 2) est plus basse que celle des LDL₁ natives (position 1), donc les LDL₁ modifiées sont plus denses que leurs homologues natives. Par contre, il n'y a pas de différence de densité entre les LDL₂ modifiées (position 4) et les LDL₂ natives (position 3). Étonnamment, les LDL₃ modifiées (position 6) sont moins denses que les LDL₃ natives (position 5).

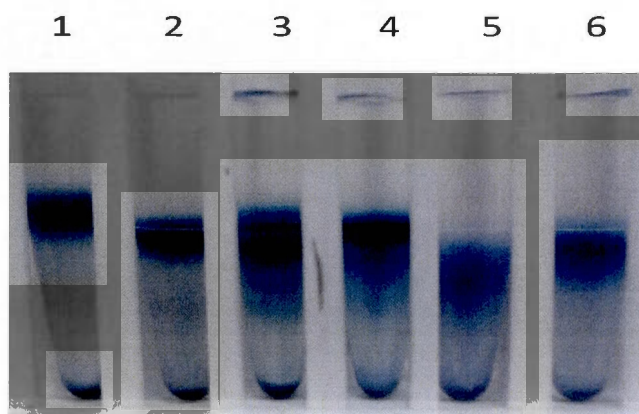
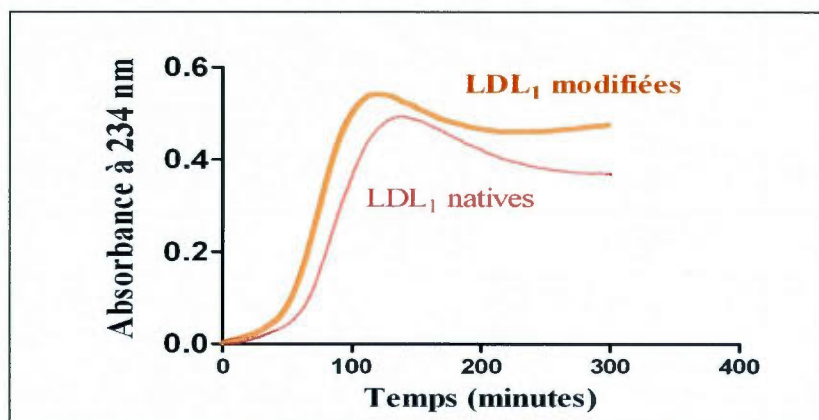


Figure 3.5 : Densité des différentes sous-classes de LDL ayant subies ou non de la captation sélective *in vivo*. Les échantillons (100 µg) ont subi une centrifugation sur gradient de densité discontinu tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. **1:** LDL₁ natives. **2:** LDL₁ modifiées. **3:** LDL₂ natives. **4:** LDL₂ modifiées. **5:** LDL₃ natives. **6:** LDL₃ modifiées. Les expériences ont été réalisées à 4 reprises et chaque essai a été fait en duplicata.

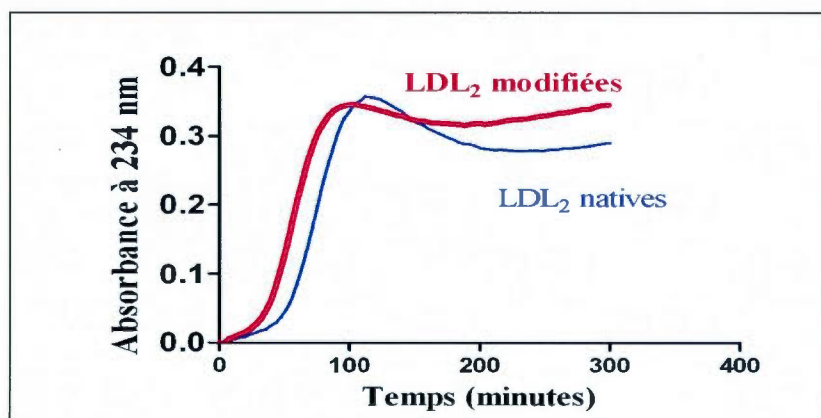
3.5 L'oxydation des différentes sous-classes de LDL

Afin de déterminer la sensibilité à l'oxydation des sous-classes de LDL, l'évolution de la formation des diènes conjugués a été suivie par la mesure de l'absorbance à 234 nm. En général, les courbes ainsi obtenues montrent une oxydation des LDL en 3 phases : phase de latence, phase de propagation et seuil d'oxydation. La phase de latence est la période durant laquelle les antioxydants des LDL sont consommés et retarde ainsi l'oxydation des acides gras polyinsaturés des LDL. Une fois cette période terminée (l'absorbance augmente), la phase de propagation de l'oxydation des acides gras commence. Tel que démontré dans le tableau 3.1 et la figure 3.6 (A, B et C), la phase de latence ne révèle aucune différence significative entre les différentes sous-classes de LDL natives. Cependant, le seuil d'oxydation des LDL₁ natives est atteint en premier, suivi de celui des LDL₂ natives et enfin celui des LDL₃ natives. D'après le tableau 3.1 et la figure 3.6 A, les LDL₁ modifiées ont une phase de latence plus courte ($35,5 \pm 4,3$ min) comparativement à celle des LDL₁ natives ($53,6 \pm 2,7$ min). Statistiquement, ces résultats sont significatifs ($p < 0,005$), donc, il semblerait que les LDL₁ modifiées soient plus sensibles à l'oxydation que les LDL₁ natives. L'oxydation des LDL₂ modifiées (figure 3.6 B) commence plus tôt que celle des LDL₂ natives ($34,8 \pm 1,4$ min versus $51,5 \pm 2,8$ min, $p < 0,005$). Les résultats de la figure 3.6 C montrent que les LDL₃ natives sont plus résistantes à l'oxydation ($48,0 \pm 4,3$ min) que les LDL₃ modifiées ($29,0 \pm 2,5$ min) ($p < 0,05$). D'après les résultats obtenus, toutes les LDL₁, LDL₂ et LDL₃ modifiées qui ont subi l'activité du SR-BI dans la circulation de la souris semblent être plus sensibles à l'oxydation que leurs LDL natives respectives.

A.



B.



C.

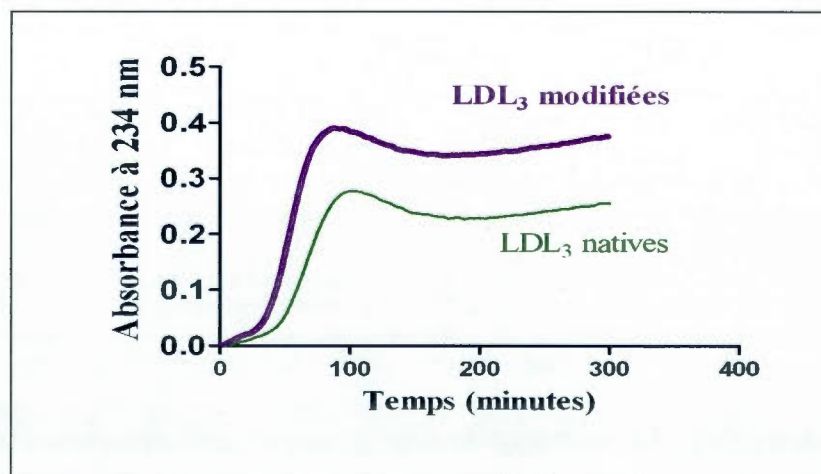


Figure 3.6 : Courbe cinétique d'oxydation des différentes sous-classes de LDL ayant subies ou non de la captation sélective *in vivo*. Les différentes sous-classes de LDL (50 $\mu\text{g/ml}$ dans du PBS) ont été oxydées avec 1,6 $\mu\text{mol/l}$ de CuSO_4 . La formation des diènes conjugués est évaluée à chaque 4 minutes pendant 5 heures à une longueur d'onde de 234 nm. **A :** LDL₁ natives et modifiées. **B:** LDL₂ natives et modifiées. **C:** LDL₃ natives et modifiées. Les courbes d'oxydation sont représentées à partir d'expériences qui ont été réalisées à 4 reprises et chaque essai a été fait en duplicata. L'analyse statistique utilisée est la régression non linéaire.

Tableau 3.1 : Les paramètres d'oxydation *in vitro* des différentes sous-classes de LDL natives et modifiées.

Lipoprotéines	Paramètres		
	Phase de latence (min)	Phase de propagation (Abs/min x 1000)	Seuil d'oxydation (min)
LDL₁			
Natives	53,6 \pm 2,7	9,1 \pm 1,1	133,0 \pm 5,9
Modifiées	35,5 \pm 4,3 **	7,9 \pm 1,1	117,3 \pm 11,6
LDL₂			
Natives	51,5 \pm 2,8	5,6 \pm 0,9	121,0 \pm 7,1
Modifiées	34,8 \pm 1,4 **	6,5 \pm 0,7	113,3 \pm 8,1
LDL₃			
Natives	48,0 \pm 4,3	6,1 \pm 0,5	118,0 \pm 6,6
Modifiées	29,0 \pm 2,5 *	8,3 \pm 1,1	94,3 \pm 1,2 *

Les paramètres d'oxydation sont déterminés à partir des courbes cinétiques d'oxydation. La phase de latence est mesurée par l'interception de la tangente de la phase d'oxydation et l'axe des temps. La phase de propagation est le taux maximal de LDL oxydées détectées dans la courbe cinétique. Le seuil d'oxydation est l'intervalle entre l'ajout du CuSO_4 et le temps auquel le maximum d'absorbance à 234 nm est atteint. (Abs) indique l'absorbance et (min) indique les minutes. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm S.E.M ($n=4$) et chaque essai a été fait en duplicata. L'analyse statistique a été faite avec le test t de Student. * $p < 0,05$. ** $p < 0,005$.

3.6 Le transfert des esters de cholestérol des $^3\text{H-EC-HDL}_3$ vers les différentes sous-classes de LDL par l'action de la CETP

La figure 3.7 montre les effets de l'incubation entre les $^3\text{H-EC-HDL}_3$ et les différentes sous-classes de LDL en présence de la CETP qui assure le transfert des EC des HDL vers les LDL. Le pourcentage de transfert des EC est la différence entre le pourcentage de transfert des EC vers les LDL en présence de la CETP et celui en absence de la CETP. Ainsi, cette figure démontre un transfert important des EC vers toutes les préparations de LDL. Cependant, cette même figure montre qu'il y a 11% moins de transfert des EC aux LDL_3 natives qu'aux LDL_1 natives ($p < 0,05$) et une tendance à la diminution ($p = 0,055$) pour les LDL_3 natives par rapport aux LDL_2 natives. Par contre, il n'y aucune différence significative de transfert des EC entre les LDL_2 et les LDL_1 natives. Ces résultats montrent que le transfert des EC des $^3\text{H-EC-HDL}_3$ est plus important vers les sous-classes 1 et 2 des LDL natives que vers la sous-classe 3. Toutefois, si on compare les résultats obtenus avec les LDL natives et modifiées de chaque sous-classe, on remarque qu'il n'y a aucune différence significative dans le transfert des EC.

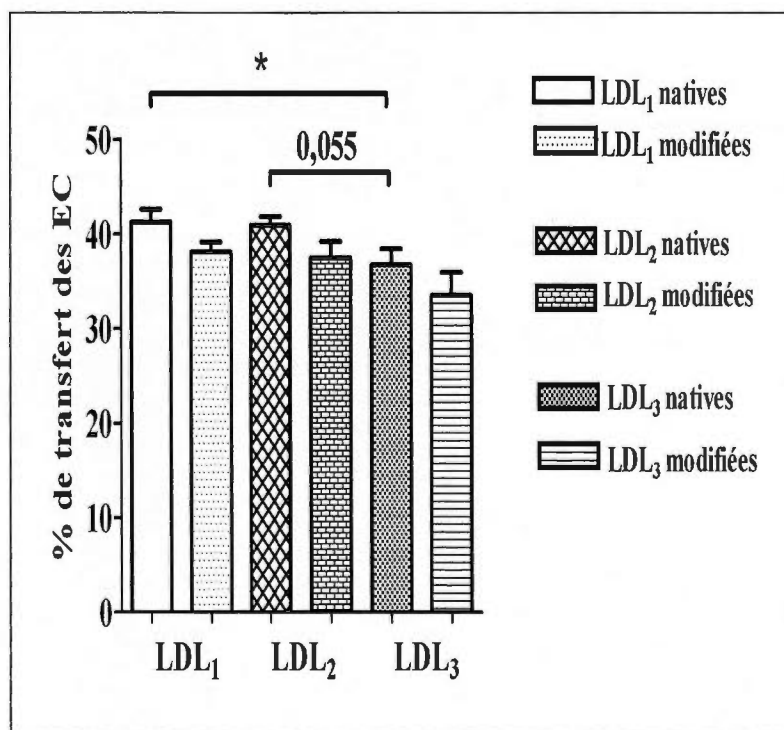


Figure 3.7 : Transfert des esters de cholestérol des ^3H -EC-HDL₃ vers les LDL par la CETP. Les LDL (20 μg) sont incubées en présence de 10 μg de ^3H -CE-HDL₃ tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. Les valeurs sont des moyennes \pm S.E.M (n= 4) et chaque essai a été fait en duplicata. L'analyse statistique a été faite avec le test t de Student. $*p < 0,05$.

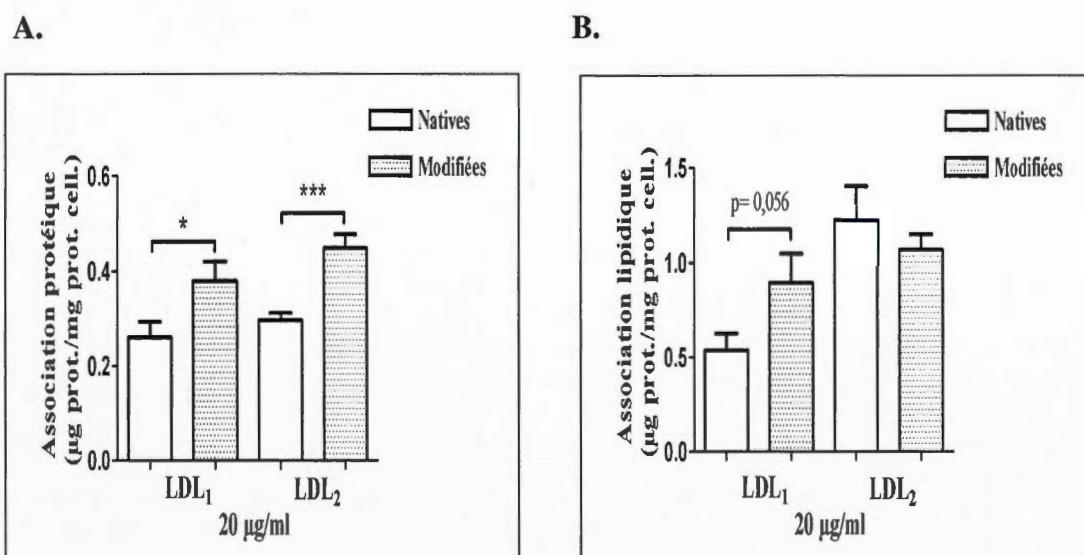
3.7 L'association des LDL₁ et des LDL₂ natives et modifiées aux cellules HepG2

Le but de cet essai est de déterminer *in vitro* le taux de captation sélective des EC des différentes préparations de LDL. Pour y arriver des cellules HepG2 sont incubées avec des LDL marquées à l'¹²⁵I (marqueur protéique des LDL) ou à l'³H-EC (marqueur des EC des LDL). Nous avons choisi deux concentrations à tester, c'est-à-dire 20 et 40 µg/ml. La captation sélective est par la suite calculée en soustrayant les valeurs de l'association et de dégradation des ¹²⁵I-LDL aux valeurs de l'association de ³H-EC-LDL. Tel qu'expliqué précédemment dans la section Matériel et méthodes, fautes de quantités suffisantes de LDL₃, ces études n'ont été accomplies qu'avec les LDL₁ et LDL₂.

Les résultats observés au niveau de chacune des figures 3.8 B, 3.9 B, 3.8 C et 3.9 C montrent que comparativement aux LDL₁ natives, il y a en moyenne 2,6 fois plus d'association lipidique et 4,6 fois plus de captation sélective d'EC pour les LDL₂ natives. Par contre, aucune différence significative n'est constatée au niveau de l'association protéique et de la dégradation entre les LDL₁ et LDL₂ natives.

La figure 3.8 (A et B) montre que l'association protéique et lipidique est plus importante pour les LDL₁ modifiées que pour les LDL₁ natives. Par rapport aux LDL₁ natives, une augmentation de 46% est observée dans l'association protéique pour les LDL₁ modifiées et de 67% pour l'association lipidique des LDL₁ modifiées. Ces différences sont statistiquement significatives. Pour ce qui est des ¹²⁵I-LDL₂ modifiées, celles-ci s'associent plus aux récepteurs des cellules HepG2 que leurs homologues natives et leurs niveaux d'association sont supérieurs de 52% à ceux des ¹²⁵I-LDL₂ natives pour la concentration de 20 µg/ml utilisées dans l'essai (figure 3.8 A). Toutefois, aucune différence significative n'est observée pour l'association lipidique entre les LDL₂ natives et modifiées (figure 3.8 B). La figure 3.8 C montre qu'il y a 86% plus de captation sélective d'EC pour les LDL₁ modifiées par rapport à

leurs homologues natives. Comparativement aux LDL₁ natives, les LDL₁ modifiées semblent donc s'associer d'une façon plus importante aux SR-BI des cellules HepG2, ce qui se traduit par une captation sélective plus élevée de leurs EC. Aussi, la captation sélective des EC des LDL₂ modifiées est inférieure à celle des LDL₂ natives et cette diminution est statistiquement significative. Elle est de 41%. Contrairement à ce qui a été observé au niveau des LDL₁ natives et modifiées, les LDL₂ natives semblent être de meilleurs donneurs d'EC par la voie de SR-BI comparativement aux LDL₂ modifiées. La figure 3.8 D montre que la dégradation des protéines des LDL₁ modifiées est significativement plus élevée de 25% par rapport à celle des LDL₁ natives, révélant une activité plus importante du rLDL sur les LDL₁ modifiées que sur leurs homologues natives. En revanche, aucune différence significative n'est observée pour la dégradation des LDL₂ natives et modifiées par les cellules HepG2.



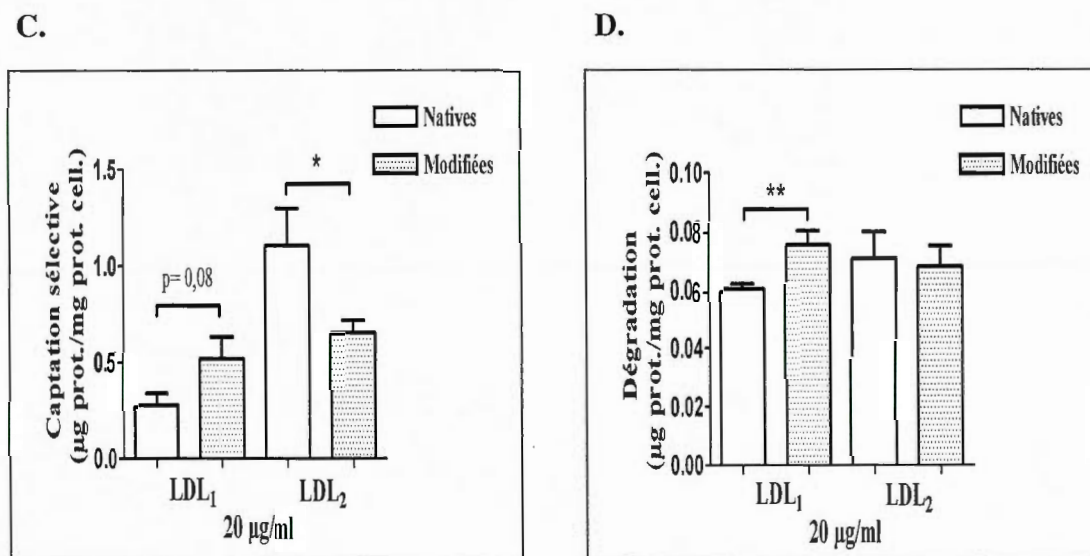


Figure 3.8 : Étude *in vitro* du métabolisme des LDL₁ natives et modifiées par les cellules HepG2 à une concentration de 20 µg/ml. A: Association protéique. B: Association lipidique. C: Captation sélective des EC. D: Dégradation. Vingt µg/ml de LDL qui sont marquées soit à l'¹²⁵I dans leur partie protéique ou au ³H-CE dans leur partie lipidique ont été utilisés dans les essais décrits dans la section Matériel et méthodes. Les valeurs sont des moyennes ± S.E.M (n=5) et chaque essai a été fait en duplicata. L'analyse statistique a été faite avec le test t de Student. **p* < 0,05. ***p* < 0,005.

Pour ce qui est de la figure 3.9, une concentration de 40 µg/ml a été utilisée et les résultats obtenus pour chacune des sous-classes de LDL₁ et LDL₂ sont les mêmes, à part que, les valeurs obtenues sont plus élevées en raison de la plus grande quantité de LDL testée.

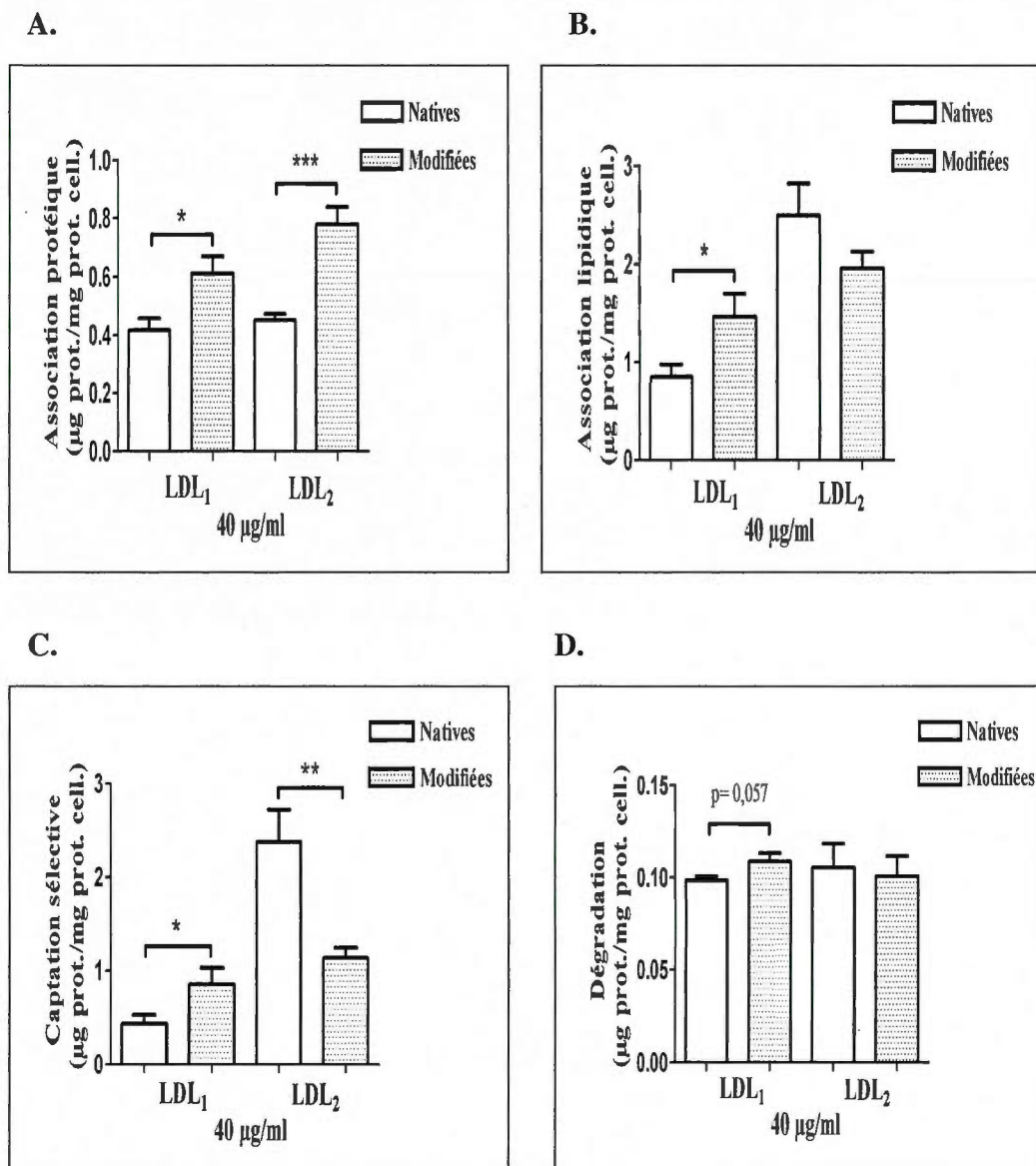


Figure 3.9 : Étude *in vitro* du métabolisme des LDL₁ et LDL₂ natives et modifiées par les cellules HepG2 à une concentration de 40 µg/ml. A: Association protéique. B: Association lipidique. C: Captation sélective. D: Dégradation. Quarante µg/ml de LDL qui sont marquées soit à l'¹²⁵I dans leur partie protéique ou au ³H-CE dans leur partie lipidique ont été utilisés dans les essais décrits dans la section Matériel et méthodes. Les

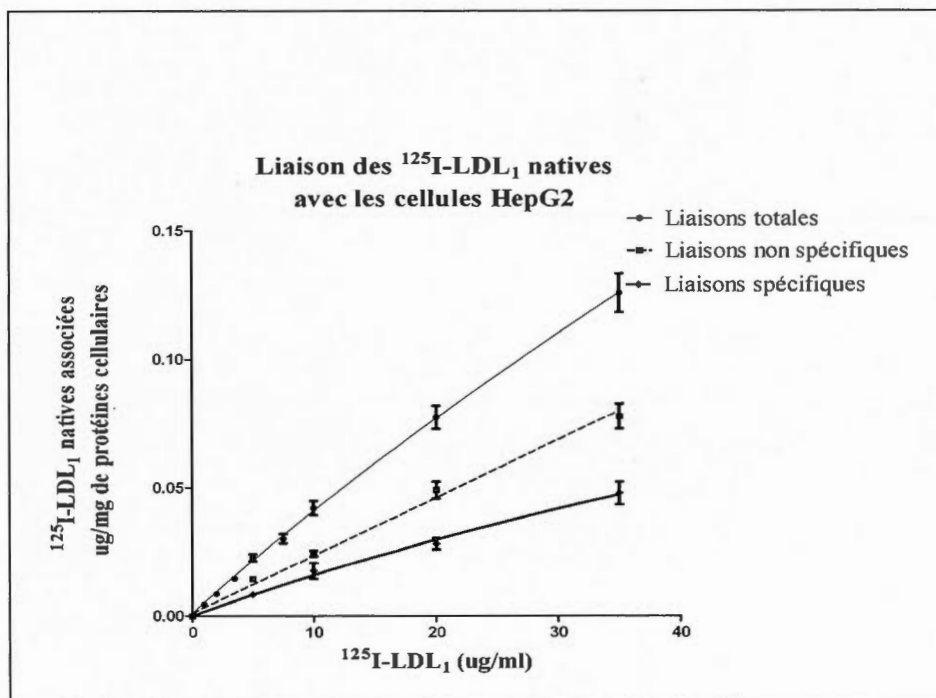
valeurs sont des moyennes \pm S.E.M (n=7) et chaque essai a été fait en duplicata. L'analyse statistique a été faite avec le test t de Student. * $p < 0,05$. ** $p < 0,005$. *** $p < 0,0001$.

3.8 Critères de la liaison des LDL₁ natives et modifiées et des LDL₂ natives et modifiées aux rLDL des cellules HepG2

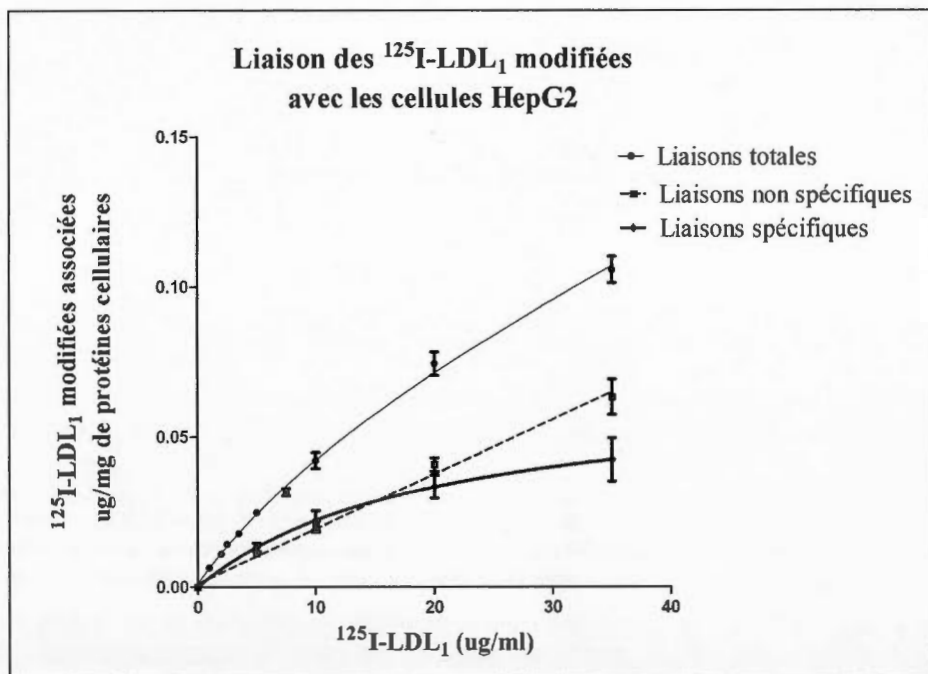
Les essais de liaison des différents types de ^{125}I -LDL ont été réalisés avec les cellules HepG2 en présence d'un excès de 100 fois de HDL₃ afin d'empêcher les LDL de se lier aux SR-BI et pouvoir ainsi mesurer strictement la liaison des LDL aux rLDL. Les résultats sont présentés sous forme graphique (moyenne \pm écart type). Ainsi, on retrouve, dans la figure 3.10, des courbes de liaison totale, des droites de liaison non-spécifique obtenues grâce à l'ajout d'un vaste excès de LDL non radioactives et des courbes de liaison spécifique générées par le calcul de la différence entre les deux premiers types de liaison. Essentiellement, ce type de présentation révèle que tous les types de LDL testées se lient spécifiquement au rLDL des cellules HepG2. Pour en dériver les critères de liaison (K_d et B_{\max}), la méthode de Scatchard a été utilisée. Ainsi, chaque courbe de liaison spécifique a été traitée de la sorte et les résultats apparaissent au Tableau 3.2.

Le tableau 3.2 montre qu'il n'y a pas de différence entre les K_d et B_{\max} de la liaison spécifique des ^{125}I -LDL₁ natives et des ^{125}I -LDL₂ natives aux rLDL des cellules HepG2. Ceci, nous indique que ce récepteur n'a pas de préférence de liaison pour l'une ou l'autre des LDL₁ et des LDL₂ natives. Le tableau 3.2 révèle aussi une plus forte affinité de liaison (augmentation de 56%) envers les ^{125}I -LDL₁ modifiées qu'envers les LDL₁ natives (figure 3.8 D). Des résultats très similaires ont été obtenus pour les ^{125}I -LDL₂, tel que le démontre ce même tableau.

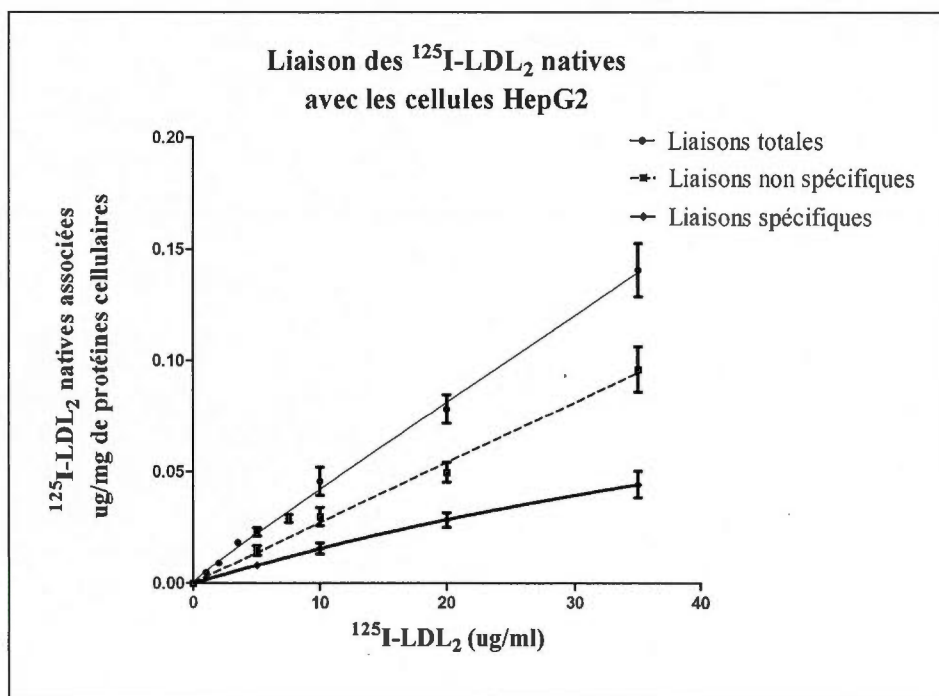
A.



B.



C.



D.

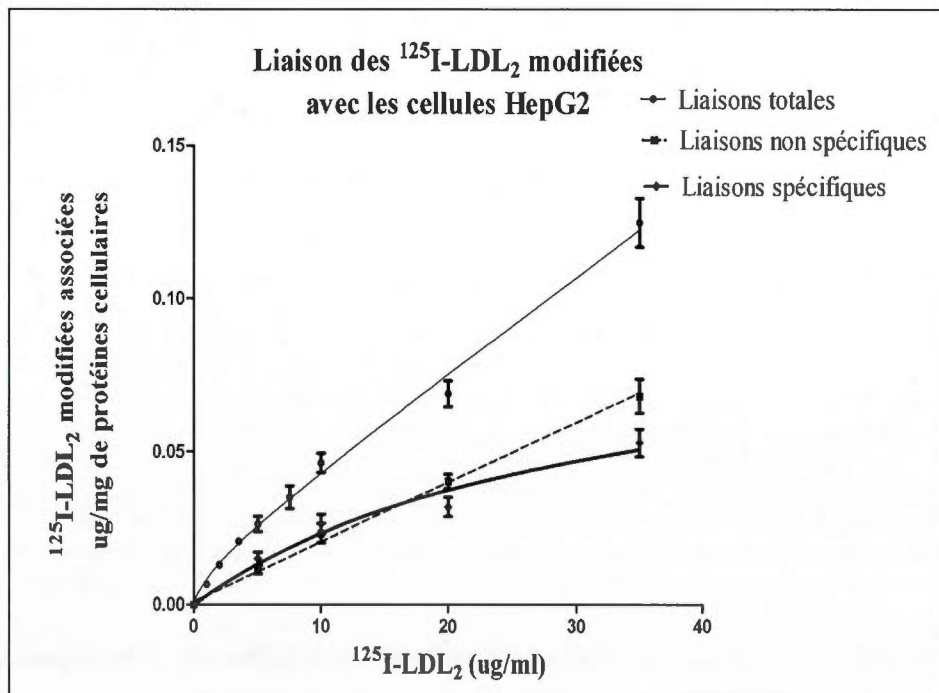


Figure 3.10 : Liaison des ^{125}I -LDL₁ et ^{125}I -LDL₂ natives et modifiées avec les cellules HepG2. Les essais de liaison des ^{125}I -LDL₁ et ^{125}I -LDL₂ liées aux cellules HepG2 ont été réalisés tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. **A :** Liaison des ^{125}I -LDL₁ natives avec les cellules HepG2. **B :** Liaison des ^{125}I -LDL₁ modifiées avec les cellules HepG2. **C :** Liaison des ^{125}I -LDL₂ natives avec les cellules HepG2. **D :** Liaison des ^{125}I -LDL₂ modifiées avec les cellules HepG2. Les valeurs sont représentées en moyenne avec écart type. Les expériences ont été réalisées à 6 reprises et chaque essai a été fait en duplicata. L'analyse statistique a été faite avec le test t de Student.

Tableau 3.2 : Les paramètres (Kd et Bmax) de la liaison spécifique des ^{125}I -LDL₁ et ^{125}I -LDL₂ aux cellules HepG2.

	Kd		Bmax	
	(µg de prot. / ml)		(µg de prot. / mg de prot. cell.)	
Lipoprotéines	Natives	Modifiées	Natives	Modifiées
LDL ₁	18,6 ± 3,1	11,9 ± 1,2 *	0,06 ± 0,008	0,06 ± 0,007
LDL ₂	14,9 ± 1,7	9,6 ± 1,4 *	0,06 ± 0,009	0,06 ± 0,007

Les valeurs du Kd et du Bmax de chacune des LDL₁ et des LDL₂ natives et modifiées ont été déterminées à partir du graphique de Scatchard. Les valeurs sont des moyennes ± S.E.M (n=6) et chaque essai a été fait en duplicata. L'analyse statistique a été faite avec le test t de Student. * $p < 0,05$ entre LDL natives et modifiées.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Notre objectif de recherche visait à comprendre les effets de la captation sélective des EC des différentes sous-classes de LDL (LDL₁, LDL₂ et LDL₃) par le SR-BI et les différentes modifications que cela peut engendrer tant au niveau biochimique qu'au niveau métabolique.

4.1 La composition chimique des LDL

Des études réalisées sur les différentes fractions de LDL comprises entre les densités 1,019-1,063 g/ml-ont démontré que plus la densité des LDL augmente, plus la teneur en lipides diminue (Capell *et al.* 1996). Effectivement, nous avons obtenu des résultats similaires aux études précédentes car les densités des différentes sous-classes de LDL sont de 1,020-1,034, 1,034-1,044 et 1,044-1,063 g/ml, pour les LDL₁, LDL₂ et LDL₃, respectivement. Les niveaux de TG, CT, CL et EC diminuent pour les LDL₂ par rapport à ceux des LDL₁ et la teneur en lipides des LDL₃ diminue encore plus par rapport à celle des LDL₂.

Les études réalisées avec une fraction totale de LDL par Brodeur *et al.* (2005) ont montré qu'il y avait 31% moins d'EC dans les LDL modifiées par rapport aux LDL natives. Notre étude a démontré qu'il y avait une diminution de seulement 15% en EC pour les LDL₁ modifiées, et pas de pertes significatives pour les deux autres sous-classes de LDL. Fait à noter puisque les LDL₁ représentent la sous-classe de LDL la plus importante des LDL, nous nous serions attendus à avoir des résultats similaires à ceux obtenus par Brodeur *et al.* du moins pour cette sous-classe. Cette perte de 50%

en appauvrissement en EC en ce qui concerne les LDL₁ par rapport aux LDL totaux peut être expliquée par ces éléments suivants :

- 1) L'étude de Brodeur *et al.* a été réalisée avec des souris C57BL alors que la nôtre utilisait des souris CD1. Il est donc possible que des variations génétiques entre ces différentes souches de souris soient responsables des différences de résultats rencontrées.
- 2) Pour maximiser la captation sélective *in vivo*, nous avons prolongé de deux heures le temps de résidence des sous-classes de LDL dans la circulation sanguine (5 heures au lieu des 3 heures de l'étude de de Brodeur *et al.*). Or ce temps de résidence accru peut avoir favorisé d'autres phénomènes. Ainsi, il est probable que les LDL injectées aux souris ont eu assez de temps (5 heures) pour se procurer du cholestérol lors de leur séjour dans la circulation sanguine. Cet enrichissement pourrait provenir des cellules endothéliales par un mécanisme d'efflux tel celui connu pour l'efflux de cholestérol impliquant les HDL et l'ABCA1 ou le SR-BI (Hoekstra *et al.* 2003 ; Von Eckardstein & Rohrer 2009) et/ou par un transfert de cholestérol en provenance des HDL murines ou de PL par l'action de la PLTP. En effet, même si la souris n'exprime pas de CETP, des transferts de cholestérol entre LDL et HDL peuvent survenir en circulation. Notre propre analyse *in vitro* démontre, en effet, un certain niveau de transfert en absence de CETP (35%, 30%, 33% pour les LDL₁, LDL₂ et LDL₃ natives) versus (34%, 37%, 39% pour les LDL₁, LDL₂ et LDL₃ modifiées).

Il est aussi important de tenter d'expliquer comment il se fait qu'une diminution significative en EC a été détectée pour les LDL₁ mais pas pour les deux autres sous-classes. Des études réalisées sur les HDL ont démontré que la captation sélective des EC par les cellules HepG2 se voit diminuée par un taux élevé en TG (Greene *et al.* 2001). Or, d'après notre étude *in vivo*, le ratio TG/protéine est plus faible pour les LDL₂ et LDL₃ que pour les LDL₁ (figure 3.1 et 3.2 C). Donc la non-détection d'une

perte d'EC pour les LDL₂ et LDL₃ ne pourrait être expliquée par la composition en TG, à moins que le mécanisme de captation sélective des EC des LDL par le SR-BI se distingue carrément de celui envers les HDL. Il demeure toutefois possible que les LDL₂ et LDL₃ ayant subies de la captation sélective des leurs EC par le SR-BI deviennent de meilleurs accepteurs, que les LDL₁, de cholestérol de provenance cellulaire ou transféré des HDL. En appui à cette hypothèse, nous avons observé que, respectivement, les LDL₁ et LDL₂ et LDL₃ modifiées se sont vues enrichies en CT (11%, 20% et 46%) (figure 3.2 A) et en CL (1,9, 2,2 et 2,7 fois) (figure 3.2 B) par rapport à leurs formes natives. Ainsi, il apparaît que plus les LDL sont petites et denses, plus elles s'enrichissent en cholestérol dans la circulation sanguine et c'est sans doute la raison pour laquelle nous n'avons pas été en mesure de détecter l'effet escompté par la captation sélective soit celui d'une perte d'EC dans les LDL₂ et LDL₃. Ou bien, l'augmentation du CT dans les LDL modifiées est due à une acquisition de CL. Par la suite, la perte des EC due à SR-BI peut probablement être compensée par un gain de CL et son estérification par la LCAT utilisant les PL acquis par l'action de la PLTP. Nos résultats sont novateurs concernant les effets de la circulation sanguine sur les trois sous-classes de LDL mais évidemment d'autres investigations sont requises pour comprendre les phénomènes observés sur les taux de cholestérol.

D'autre part, les résultats ont démontré des différences de niveaux de TG entre les LDL natives et modifiées (figure 3.1). La diminution de la teneur en TG des LDL modifiées par rapport aux natives s'explique par l'hydrolyse réalisée par la lipase hépatique et/ou la lipoprotéine lipase dans la circulation des souris CD1. D'ailleurs, certaines études ont stipulé que la perte des TG des HDL pouvait être la conséquence de l'hydrolyse effectuée par la lipase hépatique (Goldberg *et al.* 1982). Aussi, l'étude réalisée dans notre laboratoire sur des rats a permis de démontrer qu'en bloquant l'action de la LPL par l'injection de protamine, les niveaux de TG des LDL augmentent par rapport à ceux des rats contrôles (Ouellet et Brissette, résultats

personnels). La perte des TG des différentes sous-classes de LDL peut être expliquée également par le fait que les LDL qui ont séjournées dans la circulation murine auraient aussi subi de la captation sélective de leurs TG. Des études similaires réalisées sur les cellules Y1-BS1 (lignée cellulaire cortico-surrénalienne murine) ont démontré que le SR-BI (Babitt *et al.* 1997) avait la capacité de prendre les TG des HDL et que cela pouvait s'appliquer *in vivo* (Green & Pittman, 1991).

4.2 La taille et la densité des LDL

En accord avec d'autres études (Berneis & Krauss, 2002 ; Campos *et al.* 1996), spécifiant que plus les LDL sont denses, plus elles sont petites, nous avons pu démontrer qu'effectivement les LDL₃ sont plus petites que les LDL₂ et que celles-ci sont plus petites à leur tour que les LDL₁. La densité des différentes sous-classes de LDL a été également confirmée par nos résultats obtenus à partir de la méthode de Terpstra (Terpstra *et al.* 1981). Effectivement, tel qu'attendu, les LDL₃ sont plus denses que les LDL₂ et ces dernières sont plus denses que les LDL₁ (figure 3.5). De nombreuses autres études ont démontré également que la taille et la densité des LDL prédominantes corrèlent fortement avec les niveaux de TG plasmatiques (Krauss *et al.* 1988 ; McNamara *et al.* 1987 ; McNamara *et al.* 1992).

Les LDL modifiées obtenues suite à la captation sélective des LDL natives par le SR-BI, *in vivo*, semblent avoir des différences de taille et de densité par rapport à leurs formes natives. D'ailleurs, la migration de ces LDL sur gel NDGGE a révélé que les LDL₁ modifiées étaient légèrement plus petites que les natives. Ceci rejoint ce qui a été démontré au préalable dans notre laboratoire (Brodeur *et al.* 2005) car les LDL injectées puis récupérées 3 heures plus tard semblaient être de plus petites tailles. Donc, il semble que la captation sélective a réduit la taille des LDL₁ modifiées à cause de la captation d'EC par le SR-BI (figure 3.2 C). Aussi, nous avons démontré que les LDL₁ modifiées sont plus denses que leur forme native. L'augmentation de

leur densité est bel et bien corrélée avec la diminution de leur taille. Cependant, des résultats différents de ceux des LDL₁, ont été obtenus pour chacune des LDL₂ et LDL₃ modifiées par rapport à leurs formes natives. Ainsi, nos résultats ont démontré qu'il n'y avait pas de différence dans la taille et la densité entre les LDL₂ natives et modifiées. Ceci, s'explique par le fait que ces LDL, suite à leur captation sélective, n'ont pas perdu assez de lipides pour constater des différences pour la taille et la densité de celles-ci car plus les lipoprotéines perdent de lipides, plus elles sont petites et plus elles sont denses. Aussi, selon certaines études, les LDL en circulation perdent leurs TG et leurs phospholipides de surface grâce à l'action de la lipase hépatique qui convertit de ce fait ces LDL en molécules petites et denses (Caslake & Packard, 2004). D'après nos résultats, malgré que les LDL₂ modifiées aient perdu 41% de leurs TG par rapport aux LDL₂ natives, nous n'avons pas observé une diminution de taille et de densité de celles-ci. Il est possible que ces LDL₂ ayant subies la captation sélective se soient enrichies par la suite en CL qui va s'estérifier par l'action de la LCAT (augmentant ainsi le niveau de CT), ce qui a permis à celles-ci de reprendre leur taille initiale. Pour ce qui est des LDL₃, étonnamment, nos résultats montrent que les LDL₃ modifiées sont devenues plus grosses et moins denses que leurs homologues natives (figure 3.3 et 3.5). La captation sélective des EC de ces LDL₃, ou le temps de résidence dans la circulation sanguine, aurait permis l'enrichissement de celles-ci en lipides grâce aux lipoprotéines circulantes de la souris. Probablement, qu'il a eu un transfert de lipides entre ces LDL et les HDL de souris malgré l'absence de la CETP. Il est aussi possible tel que mentionné plus haut qu'elles aient acquis du CL en provenance des cellules. Donc, vraisemblablement, nous avons démontré par cette étude des échanges dynamiques dans la circulation sanguine puisque les LDL₁ modifiées semblent devenir des LDL₂, alors que les LDL₃ modifiées s'apparentent aux LDL₂. Ceci est certainement un élément novateur de notre étude.

4.3 La charge des LDL

Afin de démontrer la mobilité électrophorétique des sous-classes de LDL, ces dernières ont été migrées sur gel d'agarose/barbital. Les résultats obtenus montrent qu'il y a peu de différence de charge entre les LDL₁, LDL₂ et LDL₃ natives (figure 3.4). Toutefois, des différences de charge sont observées entre les sous-classes de LDL natives et modifiées. Suite à leur captation sélective par le SR-BI, nous avons pu constater que chacune des LDL₁ et LDL₃ modifiées étaient chargées plus négativement que leurs formes natives car ces LDL migraient plus loin dans le gel. Cette migration rapide sur le gel, suggère que ces LDL ont peut-être subi une oxydation légère soit par contact direct avec les constituants du sang de la souris, soit par contact avec les vaisseaux. D'autres études ont suggéré également que l'augmentation de la mobilité électrophorétique des LDL est associée à l'oxydation de ces dernières (Parthasarathy *et al.* 1986) et que les LDL oxydées favorisent la formation des diènes conjugués (Demuth *et al.* 1996). Alternativement, il est possible que le ratio charge/surface augmente à cause de la réduction de la taille de ces LDL. Ce ratio pourrait être calculé au moyen de la taille sur gel NDGGE et la charge obtenue sur gel d'agarose. Malheureusement, cette dernière alternative est à discriminer car les LDL₃ modifiées sont de plus grosses tailles. Pour ce qui est des LDL₂ modifiées, nous avons observé le phénomène inverse c'est-à-dire que ces LDL qui ont séjournées dans la circulation de la souris sont étonnamment moins chargées négativement comparativement à leurs formes natives. Ceci dit, nous pourrions penser que ces LDL₂ n'ont pas subi de stress oxydatif au courant de leur passage dans le sang de la souris, mais la raison pour ceci nous échappe.

4.4 L'oxydation des LDL *in vitro*

L'étude de susceptibilité à l'oxydation réalisée sur les différentes sous-classes de LDL, *in vitro*, n'a révélé aucune différence significative entre les sous-classes de LDL natives. Toutefois, le tableau 3.1 montre une tendance de diminution au niveau de la phase de latence des LDL₃ natives, sachant que, plus la phase de latence est courte, plus la LDL est sensible à l'oxydation. D'ailleurs, l'équipe de Tribble a pensé que les différentes sous-fractions de LDL diffèrent dans leur sensibilité à l'oxydation, *in vitro*, et que les LDL prédominantes (LDL₁) sont plus résistantes, alors que, les LDL petites et denses sont plus sensibles à l'oxydation (Tribble *et al.* 1992 ; Tribble, 1995). Aussi, nos résultats ont démontré que la vitesse de propagation des LDL₁ natives est plus importante, suivi de celle des LDL₂ natives et enfin celle des LDL₃ natives. Ceci, est tout à fait en accord avec les résultats obtenus de leur composition chimique en TG et en EC (figure 3.1 et 3.2 C), car nous supposons que plus les LDL sont riches en TG et en EC, plus les chaînes d'acides gras insaturés sont appelées à être oxydées.

Les trois sous-classes de LDL ayant subies la captation sélective par SR-BI chez la souris sont toutes plus sensibles à l'oxydation que leurs formes natives. Cela suggère que ces LDL ont amorcé leur oxydation dans la circulation de souris. D'ailleurs, les résultats du tableau 3.1 ont montré que les phases de latence de chacune des LDL modifiées sont courtes par rapport à leurs formes natives respectives. L'oxydation rapide de ces LDL semble avoir un lien avec l'enrichissement de celles-ci en lipides (CT et CL). Tout d'abord, les radicaux libres s'attaquent aux lipides des LDL, surtout les acides gras polyinsaturés. Il y a propagation de ces modifications chimiques aux autres lipides et suite à la dégradation et la libération de fragments lipidiques, il y a formation de peroxydes lipidiques. Les aldéhydes formés peuvent alors se lier à la partie protéique des LDL (apo B-100), modifiant ainsi son activité physiologique (Picard, 1998). Aussi, il se pourrait que le raccourcissement de la phase de latence des

LDL modifiées soit due à la perte de leurs anti-oxydants qui peuvent être captés par captation sélective dans certains cas, les rendant plus sensibles à une oxydation ultérieure.

4.5 Le transfert des EC des ^3H -EC-HDL₃ vers les différentes sous-classes des LDL

Il est connu que les HDL₃ transfèrent leurs EC vers les LDL en échange des TG via la CETP (Carr *et al.* 2002). Notre étude a démontré qu'effectivement en présence de la CETP, les HDL₃ marquées au ^3H -EC transfèrent leurs EC vers les différentes sous-classes de LDL et ce transfert semblait être plus important vers les LDL₁ et les LDL₂ alors qu'il l'est moins vers les LDL₃. Il est à penser que le transfert des EC des HDL₃ soit plus favorable vers les sous-classes 1 et 2 en raison de leur taux élevé de TG. Sachant que ces LDL reçoivent des EC des HDL₃ en échange de leurs TG, il est possible que plus ces LDL ont de TG, plus elles sont capables de les échanger pour des EC. D'ailleurs, les études de Guerin *et al.* (1994) ont démontré que le transfert des EC est plus efficace vers les LDL qui sont riches en TG et pauvres en EC.

Concernant les LDL modifiées, nous n'avons aperçu aucune différence significative de transfert des EC des HDL₃ vers les différentes sous-classes de LDL modifiées. Il est possible que ces LDL modifiées aient déjà reçu des EC dans la circulation de la souris mais ceci n'est malheureusement pas observé dans leur composition chimique en EC (figure 3.2 C). Il est possible que la perte des EC ait été compensée par l'action de la LCAT. De ce fait, les LDL modifiées enrichies en CT et appauvries en TG pourraient servir de donateur des EC pour les VLDL riches en TG. Ceci dit, en l'absence de CETP chez la souris, il serait intéressant de travailler sur un modèle de souris transgéniques pour la CETP humaine. Toutefois, nous avons tout de même une tendance à la diminution de transfert des EC vers ces 3 sous-classes de LDL comparativement à leurs formes natives. Cette diminution de transfert est due

probablement aux petites quantités de TG se trouvant dans les sous-classes de LDL modifiées par rapport aux sous-classes de LDL natives respectives.

4.6 Métabolisme et liaison des LDL aux SR-BI et rLDL des cellules HepG2

Notre étude a permis uniquement de tester les LDL₁ et les LDL₂ natives et modifiées sur les cellules HepG2 et non pas les LDL₃ en raison de leur faible quantité dans le sérum humain.

Les résultats des LDL₁ et des LDL₂ natives ont démontré que l'activité de SR-BI est plus forte envers les LDL₂ natives (figure 3.8 B et 3.9 B). Il se peut que plus de SR-BI des cellules HepG2 lient de LDL₂ que de LDL₁ ou que l'activité de captation sélective de SR-BI soit plus forte envers les LDL₂ que de LDL₁. Cette dernière est supportée par les travaux de Green & Pittman (1991) ayant montré par des études *in vitro* avec des fibroblastes que le taux de la captation sélective est inversement proportionnel avec la taille des particules de LDL.

Pour ce qui est des liaisons aux rLDL des cellules HepG2, nos résultats ont démontré qu'il n'y avait pas de différences significatives pour les paramètres de liaison (Kd et Bmax) entre les sous-classes 1 et 2 des LDL natives. Le rLDL est capable donc de lier ces 2 sous-classes de LDL de la même façon et elles seront de ce fait pareillement éliminées de la circulation sanguine (*in vivo*). Aussi, nos résultats d'affinité de liaison (tableau 3.2) concordent avec ceux de la dégradation (figure 3.8 D et 3.9 D). Dans ce cas, aucune différence significative n'est observée pour les niveaux de dégradation entre les LDL₁ et les LDL₂ natives. Toutefois, il y a tout de même une légère tendance à l'augmentation de la dégradation et de l'affinité de liaison des LDL₂ natives envers le rLDL des cellules HepG2. Des études ont trouvé que les LDL₁ et les LDL₃ ont une moins bonne affinité de liaison aux rLDL des cellules HepG2 et des fibroblastes comparé aux LDL intermédiaires (LDL₂) (Chappell *et al.* 1991 ;

Swinkels *et al.* 1990). Alors que, l'étude de Swinkels *et al.* (1988) n'a trouvé aucune différence de liaison des sous-fractions de LDL aux rLDL des cellules fibroblastiques et des cellules HepG2. Fait à noter, aucune de ces études n'a bloqué les SR-BI de ces cellules par un excès de HDL₃ pour empêcher les LDL de se lier à ce récepteur et permettre uniquement et avec précision l'analyse de la liaison de ces dernières aux rLDL. Cette méthode de blocage des SR-BI par les HDL₃ a été, par contre, utilisée dans notre étude *in vitro*.

Suite à leur captation sélective *in vivo*, les LDL₁ modifiées semblent être de meilleurs ligands pour le SR-BI au niveau des cellules HepG2 par rapport à leurs formes natives. Il semblerait donc que l'activité du SR-BI soit plus importante envers ces LDL modifiées, ce qui se traduit par une captation sélective plus élevée de leurs EC *in vitro* (figure 3.8). Le gel NDGGE a bel et bien confirmé que les LDL₁ modifiées sont de plus petites tailles que leurs homologues natives. Sachant que les résultats de Green et Pittman (1991) ont démontré que le taux de la captation sélective est inversement proportionnel avec la taille des particules de LDL, il est possible que l'activité de SR-BI soit plus forte envers les LDL₁ modifiées en raison de leurs petites tailles comparativement à leurs formes natives. Les résultats ont également montré que la captation sélective des LDL₂ modifiées est moins importante que celle des LDL₂ natives. Il est possible que ces LDL₂ modifiées ont probablement déjà subi la captation sélective *in vivo* ce qui a réduit les chances pour ces LDL de subir davantage la captation sélective *in vitro* car celles-ci ont moins d'EC.

Les résultats de notre étude *in vitro* ont révélé une augmentation de taux de liaison spécifique au rLDL de chacune des LDL₁ et LDL₂ modifiées comparativement à leurs formes natives respectives. Ceci a été confirmé avec le K_d (tableau 3.2) qui démontre une plus forte affinité de liaison des LDL₁ modifiées envers le rLDL, ce qui est en accord avec une augmentation de la dégradation de ces LDL₁ modifiées par ce récepteur par rapport aux LDL₁ natives (figure 3.8 D). Aussi, des résultats similaires

ont été constatés au niveau des LDL₂ modifiées, par contre, cela ne se traduit pas par une augmentation de la dégradation de celles-ci par le rLDL (figure 3.9 D). Il est possible que l'augmentation de l'affinité de liaison de chacune des LDL₁ et LDL₂ modifiées aux rLDL, *in vitro*, soit due à l'enrichissement de celles-ci en cholestérol. D'ailleurs, l'étude réalisée par Campos *et al.* (1996) a montré que l'affinité de liaison des LDL aux rLDL était significativement plus élevée chez les personnes ayant un taux élevé en cholestérol-LDL que celles qui ont un taux faible en cholestérol-LDL. Ceci rejoint les résultats de notre étude, car la concentration en cholestérol total et libre est élevée au niveau des LDL₁ et LDL₂ modifiées par rapport aux LDL₁ et LDL₂ natives (figure 3.2 A et B) et cela se traduit bien évidemment par une forte affinité de liaison de ces LDL₁ et LDL₂ modifiées pour les rLDL.

4.7 Analyse globale des effets de la captation sélective et des implications sur le caractère athérogène des LDL

Les LDL sont des transporteurs reconnus de cholestérol du foie vers les cellules et quand le taux de cholestérol est élevé dans le sang, l'excès va se déposer peu à peu dans les parois des artères pour former de véritables couches de graisse qu'on appelle plaques d'athérome. Ces dernières sont malheureusement à l'origine des maladies athérosclérotiques (Brown & Goldstein, 1984). Cependant, la captation sélective des EC des sous-classes de LDL par le SR-BI *in vivo* pourrait être favorable pour la santé. Mais, les essais d'oxydation montrent justement que ces sous-classes de LDL modifiées sont plus sensibles à l'oxydation que leurs formes natives et cela est très néfaste pour l'organisme. L'enrichissement de ces LDL modifiées en CT et CL peut être également nuisible pour la paroi cellulaire. Il est connu également que toutes les LDL sont athérogènes, mais les LDL petites et denses (LDL₃) sont considérées comme étant la sous-classe la plus athérogène (Berneis & Krauss, 2002). Ceci dit, puisque nos LDL₁ modifiées sont plus petites et plus denses, il est possible que ces LDL₁ soient plus athérogènes que les LDL₂ et les LDL₃ modifiées vu que ces deux

sous-classes sont plus grosses et moins denses que la sous-classe 1 de LDL modifiées. Aussi, il est également possible de considérer les LDL₁ modifiées comme étant une sous-classe assez voisine des LDL₂ natives. Notre étude a également démontré que contrairement aux LDL₂ modifiées, les LDL₁ et LDL₃ modifiées sont plus négativement chargées que leurs formes natives. La migration rapide de ces LDL modifiées sur le gel d'agarose/barbital nous indique que ces dernières ont probablement subi un début d'oxydation *in vivo* ce qui est très néfaste pour la santé. Toutefois, la captation sélective semble être favorable pour l'organisme car notre étude *in vitro* a démontré que l'activité de SR-BI est augmentée pour les LDL₁ modifiées et que chacune des LDL₁ et LDL₂ modifiées semblent avoir une forte affinité de liaison avec le rLDL ce qui permettrait à ces 2 sous-classes de LDL d'être éliminées plus rapidement de la circulation sanguine *in vivo*. D'autres études seront requises pour savoir si le côté négatif ou le côté positif domine.

4.8 Perspectives

D'autres études sont nécessaires pour tester les LDL₃ natives et modifiées *in vitro* sur les cellules HepG2 pour connaître leur capacité à se lier au rLDL et subir de la captation sélective de leurs EC par le SR-BI. Il serait intéressant d'étendre les études sur différents temps de résidence des sous-classes de LDL dans la circulation sanguine afin de suivre les effets en fonction du temps. De plus, il serait important de dissocier l'effet de la circulation des LDL dans le sang des souris de l'effet de la captation sélective des EC par le SR-BI en faisant des études similaires chez la souris SR-BI KO. Aussi, nous pourrions envisager d'inhiber l'action de la LPL chez la souris, ce qui va permettre de bloquer l'hydrolyse des TG des LDL par l'injection de la protamine *in vivo* afin de déterminer l'effet de la captation sélective des LDL sans l'intervention de la LPL. Enfin, il serait important de faire avec les différentes sous-classes de LDL des études d'efflux de cholestérol *in vitro* avec des fibroblastes pré-

incubés avec du cholestérol tritié, pour suivre les traces du cholestérol lors de l'efflux du cholestérol des cellules vers les LDL.

CONCLUSION

En somme, notre étude avait pour objectif de déterminer les effets de la captation sélective *in vivo* des EC des différentes sous-classes de LDL. Les résultats obtenus ont démontré des différences entre les sous-classes de LDL natives et modifiées. Suite à leur passage dans la circulation de la souris, les LDL₁ ont subi une perte de leurs EC et TG et ont eu un enrichissement en CT et CL. Ces LDL₁ sont devenues plus petites et plus denses et sont chargées plus négativement et il semblerait qu'elles soient également plus sensibles à l'oxydation. Notre étude a également démontré qu'il y a une augmentation de l'affinité de liaison aux rLDL et de l'activité de SR-BI envers les LDL₁ modifiées comparativement à leurs formes natives. Concernant les LDL₂, elles se comportent différemment des LDL₁, car cette sous-classe semble avoir perdu ses TG et s'être enrichie en CT et CL. Les résultats ont démontré qu'il n'y avait aucune différence de taille et de densité de celles-ci et elles sont moins chargées négativement et plus sensibles à l'oxydation que leurs homologues natives. Au niveau métabolique, ces LDL₂ modifiées ont plus d'affinité pour le rLDL mais subissent moins l'activité de SR-BI que leurs homologues natives. Enfin, la captation sélective des LDL₃ a permis à cette sous-classe de s'enrichir en CT et CL, d'augmenter leur taille et leur densité. Aussi, nos résultats ont indiqué qu'elles étaient plus chargées négativement et plus sensibles à l'oxydation que leur forme native. Malheureusement, cette sous-classe n'a pas été testée sur les cellules HepG2, comme nous l'avons mentionné au préalable, en raison de leur faible quantité dans le sérum humain. La captation sélective serait donc favorable pour l'organisme car elle permet aux LDL₁ l'élimination de leurs EC par le SR-BI et la dégradation complète des LDL₁ et LDL₂ par le rLDL, par contre, elle serait néfaste pour notre santé car les LDL ayant subies la captation sélective sont devenues plus sensibles à l'oxydation, ce qui procurerait à

ces LDL le pouvoir de la formation des plaques d'athéromes au niveau de la paroi des artères des cellules et l'apparition des maladies cardiovasculaires.

BIBLIOGRAPHIE

- ABIFADEL, M., VARRET, M., RABÈS, J.P., ALLARD, D., OUGUERRAM, K., DEVILLERS, M., CRUAUD, C., BENJANNET, S., WICKHAM, L., ERLICH, D., DERRÉ, A., VILLÉGER, L., FARNIER, M., BEUCLER, I., BRUCKERT, E., CHAMBAZ, J., CHANU, B., LECERF, J.M., LUC, G., MOULIN, P., WEISSENBAACH, J., PRAT, A., KREMPF, M., JUNIEN, C., SEIDAH, N.G., BOILEAU, C. 2003. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* 34: 154-156.
- ACTON, S., RIGOTTI, A., LANDSCHULTZ, K.T., XU, S., HOBBS, H.H., KRIEGER, M. 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a HDL lipoprotein receptor. *Science* 271: 518-520.
- ACTON, S.L., SCHERER, P.E., LODISH, H.F., KRIEGER, M. 1994. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 21003-21009.
- ALAUPOVIC, P. 1972. Conceptual development of the classification system of plasma proteins. *Protides Biol. Proc. Colloq.* 19: 9-19.
- ANDREELLI, F., JACQUIER, D. 2006. Place du foie dans le métabolisme des lipoprotéines. *Hépatogastro.* 13: 184-190.
- ARAI, H., KOKUBO, Y., WATANABE, M., SAWAMURA, T., ITO, Y., MINAGAWA, A., OKAMURA, T., MIYAMATO, Y. 2013. Small dense low-density lipoproteins cholesterol can predict incident cardiovascular disease in an urban japanese cohort: The Suita study. *J. Atheroscler. Thromb.* 2: 195-203.
- AUSTIN, M.A., KING, M.D., VRANIZAN, K.M., NEWMAN, B., KRAUSS, R.M. 1988. Inheritance of low density lipoprotein subclass patterns: Results of complex segregation analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 43: 838-846.
- AUSTIN, M.A., KRAUSS, R.M. 1986. Genetic control of low density lipoprotein subclasses. *Lancet* 2: 592-595.
- BABITT, J., TRIGATTI, B., RIGOTTI, A., SMART, E.J., ANDERSON, R.G.W., XU, S., KRIEGER, M. 1997. Murine SR-BI, a high density

lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J. Biol. Chem.* 272:13242–13249.

- BARTER, P.J., HOPKINS, C.J., CALVERT, G.D. 1982. Transfers and exchanges of esterified cholesterol between plasma lipoproteins. *Biochem. J.* 208: 1-7.
- BEISIEGEL, U., WEBER, W., BENGTSSON-OLIVECRONA, G. 1991. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8342-8346.
- BERNEIS, K.K., KRAUSS, R.M. 2002. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J. Lipid Res.* 43:1363-1379.
- BRAUN, A., TRIGATTI, B.L., POST, M.J., ET AL. 2002. Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apolipoprotein E-deficient mice. *Circ. Res.* 90:270–276.
- BRISSETTE, L., CHAREST, M.C., FALSTRAULT, L. 1996. Selective uptake of cholesteryl esters of low-density lipoproteins is mediated by the lipoprotein binding site in HepG2 cells and is followed by the hydrolysis of cholesteryl esters. *Biochem. J.* 318: 841-847.
- BROCKES, C., LOCHER, R., BÖTTCHER, A., SCHMITZ, G., VETTER, W. 2002. LDL-oxidation and -subgroups in normo- and hypertensive patients with and without a family history of hypertension. *Vasa* 31:75-80.
- BRODEUR, M.R., LUANGRATH, V., BOURRET, G., FALSTRAULT, L., BRISSETTE, L. 2005. Physiological importance of SR-BI in the in vivo metabolism of human HDL and LDL in male and female mice. *J. Lipid Res.* 46: 687-696.
- BROWN, M.S., DANA, S.E., GOLDSTEIN, J.L. 1973. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts by lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 2162-2166.
- BROWN, M.S., DANA, S.E., GOLDSTEIN, J.L. 1975. Receptor-dependent hydrolysis of cholesteryl esters contained in plasma low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 2925–2929.

- BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. 1984. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci. Am.* 251: 58–66.
- BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34–47.
- CALVERT, G.D., ABBEY, M. 1985. Plasma lipoproteins, apolipoproteins, and proteins concerned with lipid metabolism. *Adv. Clin. Chem.* 24: 217–298.
- CALVO, D., GOMEZ-CORONADO, D., LASCUNCION, M.A., VEGA, M.A. 1997. CLA-1 is an 85-kDa plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 2341–2349.
- CALVO, D., GOMEZ-CORONADO, D., SUAREZ, Y., LASUNCION, M.A., VEGA, M.A. 1998. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J. Lipid Res.* 39: 777–788.
- CAMPOS, H., ARNOLD, K.S., BALESTRA, M.E., INNERARITY, T.L., KRAUSS, R.M. 1996. Differences in receptor binding of LDL subfractions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16: 794–801.
- CAPELL, W.H., ZAMBON, A., AUSTIN, M.A., BRUNZELL, J.D., HOKANSON, J.E. 1996. Compositional differences of LDL particles in normal subjects with LDL phenotype A and LDL subclass phenotype B. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16: 1040–1046.
- CARR, M.C., AYYOBI, A.F., MURDOCH, S.J., DEEB, S.S., BRUNZELL, J.D. 2002. Contribution of hepatic lipase, lipoprotein lipase, and cholesteryl ester transfer protein to LDL and HDL heterogeneity in healthy women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22: 667–673.
- CASLAKE, M.J., PACKARD, C.J. 2004. Phenotypes, genotypes and response to statin therapy. *Curr. Opin. Lipidol.* 15: 387–392.
- CHAPPELL, D.A., FRY, G.L., WAKNITZ, M.A., BERNS, J.J. 1991. Ligand size as a determinant of catabolism by the low density lipoprotein (LDL) receptor pathway. *J. Biol. Chem.* 266: 19296–19302.
- COCQUEREL, L., VOISSET, C., DUBUISSON, J. 2006. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J. Gen. Virol.* 87: 1075–1084.

- COHEN, J., PERTSEMLIDIS, A., KOTOWSKI, I.K., GRAHAM, R., GARCIA, C.K., HOBBS, H.H. 2005. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat. Genet.* 37: 161–165.
- DALLONGEVILLE, J. 2006. Le métabolisme des lipoprotéines. *Cah. Nutr. Diét.* 41: 55-60.
- DEJAGER, S. 1996. Hétérogénéité des LDL. *Rev. Fr. Endocrinol. Clin. Nutr. Metab.* 2: 115-128.
- DEJAGER, S., LESNIK, P., TURPIN, G. 1995. Hétérogénéité des LDL et potentiel athérogène. *Sang Thrombose Vaisseaux* 7: 155-164.
- DE KLEIJN, D., PASTERKAMP, G. 2003. Toll-like receptors in cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Res.* 60: 58-67.
- DELAMATRE, J.G., SARPHIE, T.G., ARCHIBOLD, R.C., HORNICK, C.A. 1990. Metabolism of apoE-free high density lipoproteins in rat hepatoma cells: Evidence for a retroendocytic pathway. *J. Lipid Res.* 31: 191–202.
- DEMUTH, K., MYARA, I., CHAPPEY, B., VIDIE, B., PECH-AMSELLEM, M., HABERLAND, M., MOATTI, N. 1996. A cytotoxic electronegative LDL subfraction is present in human plasma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16: 773–783.
- EISENBERG, S. 1984. High density lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.* 25: 1017-1058.
- ENDEMANN, G., STANTON, L.W., MADDEN, K.S., BRYANT, C.M., WHITE, R.I., PROTTER, A.A. 1993. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 268: 11811-11816.
- ESCOLÀ-GIL, J.C., JULVE, J., MARZAL-CASACUBERTA, A., ORDÓÑEZ-LLANOS, J., GONZÁLEZ-SASTRE, F., BLANCO-VACA, F. 2001. Apo A-II expression in CETP transgenic mice increases VLDL production and impairs VLDL clearance. *J. Lipid. Res.* 42: 241-248.
- FEBBRAIO, M., HAJJAR, D.P., SILVERSTEIN, R.L. 2001. CD36: A class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* 108: 785–791.

- FIELDING, P., FIELDING, C.J. 1995. Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry* 34: 14288–14292.
- FRANK, P.G., MARCEL, Y.L., CONNELLY, M.A., LUBLIN, D.M., FRANKLIN, V., WILLIAMS, D.L., LISANTI, M.P. 2002. Stabilization of caveolin-1 by cellular cholesterol and scavenger receptor class B type I. *Biochemistry* 41:11931–11940.
- GINSBERG, H.N., DIXON, J.L., GOLDBERG, I.J. 1999. VLDL/LDL cascade system: assembly, secretion and intravascular metabolism of apoprotein B-containing lipoproteins. *London: Arnold, Hodder Headline Group* 55-70.
- GOLDBERG, I.J., LE, N-A., PATERNITI, J.R. JR., GINSBERG, H.N., LINDGREN, F.T, BROWN, W.V. 1982. Lipoprotein metabolism during acute inhibition of hepatic triglyceride lipase in the cynomolgus monkey. *J. Clin. Invest.* 70: 1184-1192.
- GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. 1974. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts: Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* 249: 5153–5162.
- GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. 1973. Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 2804-2808.
- GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. 2009. The LDL receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29: 431–438.
- GRAF, G.A., CONNELL, P.M., VAN DER WESTHUYZEN, D.R., SMART, E.J. 1999. The class B, type I scavenger receptor promotes the selective uptake of high density lipoprotein cholesterol esters into caveolae. *J. Biol. Chem.* 274:12043–12048.
- GRANDJEAN, P.W., CROUSE, S.F. 2004. Lipid and lipoprotein disorders. In L.M. LeMura & S.P. Von Duvillard (Eds.), *Clinical Exercise Physiology: Application and Physiological Principles*. Philadelphia: Williams & Wilkins.
- GREENE, D.J., SKEGGS, J.W., MORTON, R.E. 2001. Elevated triglyceride content diminishes the capacity of high density lipoprotein to deliver

cholesteryl esters via the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *J. Biol. Chem.* 276: 4804-4811.

- GREEN, S.R., PITTMAN, R.C. 1991. Comparative acyl specificities for transfer and selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters. *J. Lipid Res.* 32: 457-467.
- GU, X., TRIGATTI, B., XU, S., ACTON, S., BABITT, J., KRIEGER, M. 1998. The efficient cellular uptake of high density lipoprotein lipids via scavenger receptor class B type I requires not only receptor-mediated surface binding but also receptor-specific lipid transfer mediated by its extracellular domain. *J. Biol. Chem.* 273: 26338-26348.
- GUERIN, M., DOLPHIN, P.J., CHAPMAN, M.J. 1994. A new in vitro method for the simultaneous evaluation of cholesteryl ester exchange and mass transfer between HDL and apoB-containing lipoprotein subspecies: Identification of preferential cholesteryl ester acceptors in human plasma. *Arterioscler. Thromb.* 14: 199-206.
- HATCH, F.T., LEES, R.S. 1968. Practical methods for plasma lipoprotein analysis. *Adv. Lipid Res.* 6: 1-68.
- HERZ, J., CLOUTHIER, D.E., HAMMER, R.E. 1992. LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA/PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* 71: 411-421.
- HERZ, J., HAMANN, U., ROGNE, S., MYKLEBOST, O., GAUSEPOHL, H., STANLEY, K.K. 1988. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J.* 7: 4119-4127.
- HESLER, C.B., SWENSON, T.L., TALL, A.R. 1987. Purification and characterization of a human plasma cholesteryl ester transfer protein. *J. Biol. Chem.* 262: 2275-2282.
- HOBBS, H.H., BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. 1992. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum. Mutat.* 1: 445-466.
- HOEKSTRA, M., KRUIJT, J.K., VAN ECK, M., VAN BERKEL, T.J. 2003. Specific gene expression of ATP binding cassette transporters and nuclear hormone receptors in rat liver parenchymal, endothelial, and Kupffer cells. *J. Biol. Chem.* 278: 25448-25453.

- HORTON, J. D., GOLDSTEIN, J. L., BROWN, M. S. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109: 1125-1131.
- HUA, X., SAKAI, J., BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. 1996. Regulated cleavage of sterol regulatory element binding proteins requires sequences on both sides of the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 271: 10379-10384.
- HUARD, K., BOURGEOIS, P., RHAINDS, D., FALSTRAULT, L., COHN, J.S., BRISSETTE, L. 2005. Apolipoproteins C-II and C-III inhibit selective uptake of low- and high-density lipoprotein cholesteryl esters in HepG2 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 6: 1308-1318.
- IKEMOTO, M., ARAI, H., FENG, D., TANAKA, K., AOKI, J., DOHMAE, N., TAKIO, K., ADACHI, H., TSUJIMOTO, M., INOUE, K. 2000. Identification of a PDZ-domain-containing protein that interacts with the scavenger receptor class B type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6538-6543.
- ISHIBASHI, S., BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L., GERARD, R.D., HAMMER, R.E., HERZ, J. 1993. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J. Clin. Invest.* 92: 883-893.
- ISHIBASHI, S., GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S., HERZ, J., BURNS, D.K. 1994. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J. Clin. Invest.* 93: 1885-1893.
- JI, Y., JIAN, B., WANG, N., SUN, Y., DE LA LLERA-MOYA, M., PHILLIPS, M.C., ROTHBLAT, G.H., SWANEY, J.B., TALL, A.R. 1997. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein mediated cellular cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 272: 20982-20985.
- KAMBOURIS, A.M., ROACH, P.D., CALVERT, G.D., NESTEL, P.J. 1990. Retroendocytosis of high density lipoproteins by the human hepatoma cell line, HepG2. *Arteriosclerosis* 10: 582-590.
- KOCHER, O., YESILALTAY, A., CIROVIC, C., PAL, R., RIGOTTI, A., KRIEGER, M. 2003. Targeted disruption of the PDZK1 gene in mice causes tissue-specific depletion of the high density lipoprotein receptor scavenger

receptor class B type I and altered lipoprotein metabolism. *J. Biol. Chem.* 278: 52820–52825.

- KRAUSS, R.M., BURKE, D.J. 1982. Identification of multiple subfractions of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J. Lipid Res.* 23: 97-104.
- KRAUSS, R.M., WILLIAMS, P.T., LINDGREN, F.T., WOOD, P.D. 1988. Coordinate changes in levels of human serum low and high density lipoprotein subclasses in healthy men. *Arteriosclerosis* 8: 155–162.
- KRASTEVA, V., BRODEUR, M.R., TREMBLAY, F.L., FALSTRAULT, L., BRISSETTE, L. 2010. Apolipoprotein C-I reduces cholesteryl esters selective uptake from LDL and HDL by binding to HepG2 cells and lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1: 42-48.
- LAGROST, L., MASSON, D., CHAPMAN, J. 2003. Lipoprotéines et métabolisme lipidique. In : TOUSSAINT, J.F., JACOB, M.P., LAGROST, L., CHAPMAN, J. eds *Athérosclérose*. Paris : Masson 59-77.
- LANGER, T., STROBER, W., LEVY, R.I. 1972. The metabolism of low density lipoprotein in familial type II hyperlipoproteinemia. *J. Clin. Invest.* 51: 1528-1536.
- LAW, S.W., LACKNER, K.J., FOJO, S.S., HOSPATTANKAR, A., MONGE, J.C., BREWER, H.B. JR. 1986. The molecular biology of human apoA-I, apoA-II, apoC-II and apoB. *Adv. Exp. Med. Biol.* 201: 151-162.
- LIANG, K., VAZIRI, N.D. 2002. Upregulation of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in chronic renal failure. *J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283:E676-E681.
- LESNIK, P., DENTAN, C., VONICA, A., MOREAU, M., CHAPMAN, M.J. 1995. Tissue factor pathway inhibitor activity associated with LDL is inactivated by cell and copper-mediated oxidation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 1121-1130.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

- LUANGRATH, V., BRODEUR, M.R., RHAINDS, D., BRISSETTE, L. 2008. Mouse CD36 has opposite effects on LDL and oxidized LDL metabolism in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28:1290-1295.
- LUO, Y., TALL, A.R. 2000. Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element. *J. Clin. Invest.* 105: 513-520.
- MAGGI, E., CHIESA, R., MELISSANO, G., CASTELLANO, R., ASTORE, D., GROSSI, A., FINARDI, G., BELLOMO, G. 1994. LDL oxidation in patients with severe carotid atherosclerosis. A study of in vitro and in vivo oxidation markers. *Arterioscler. Thromb.* 14: 1892-1899.
- MAHLEY, R.W., INNERARITY, T.L., RALL, S.C. Jr., WEISGRABER, K.H. 1984. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid Res.* 25: 1277-1294.
- MATHEWS, C.K., VAN HOLDE, K.E., AHERN, K.G. 2000. *Biochemistry*, 3rd ed.
- MAXWELL, K.N., BRESLOW, J.L. 2004. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 7100-7105.
- MC FARLANE, A. S. 1958. Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature* 182: 53-54.
- MC NAMARA, J.R., CAMPOS, H., ORDOVAS, J.M., PETERSON, J., WILSON, P.W., SCHAEFER E.J. 1987. Effect of gender, age, and lipid status on low density lipoprotein subfraction distribution. Results from the Framingham Offspring Study. *Arteriosclerosis* 7: 483-490.
- MC NAMARA, J.R., JENNER, J.L., LI, Z., WILSON, P.W., SCHAEFER, E.J. 1992. Change in LDL particle size is associated with change in plasma triglyceride concentration. *Arterioscler. Thromb.* 12: 1284-1290.
- MC NAMARA, J.R., SMALL, D.M., LI, Z., SCHAEFER, E.J. 1996. Differences in LDL subspecies involve alterations in lipid composition and conformational changes in apolipoprotein B. *J. Lipid Res.* 37:1924-1935.
- MONTINE, K.S., BASSETT, C.N., OU, J.J., MARKESBERY, W.R., SWIFT, L.L., MONTINE, T.J. 1998. Apolipoprotein E allelic influence on human cerebrospinal fluid apolipoproteins. *J. Lipid Res.* 39: 2443-2451.

- MOORE, K.J., KUNJATHOOR, V.V., KOEHN, S.L., MANNING, J.J., TSENG, A.A., SILVER, J.M., MCKEE, M., FREEMAN, M.W. 2005. Loss of receptor-mediated lipid uptake via scavenger receptor A or CD36 pathways does not ameliorate atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *J. Clin. Invest.* 115: 2192-2201.
- NARAYAN, K.A. 1975. Analysis of lipids and lipoproteins (Perkins, E.G., ed.), pp. 225-249, American Oil Chemyst Society, Champaign, III.
- NIGON, F., LESNIK, P., ROUIS, M., CHAPMAN, M.J. 1991. Discrete subspecies of human low density lipoproteins are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor. *J. Lipid Res.* 32:1741-1753.
- OQUENDO, P., HUNDT, E., LAWLER, J., SEED, B. 1989. CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell* 58: 95-101.
- PARTHASARATHY, S., PRINTZ, D., BOYD, D., LOY, L., STEINBERG, D. 1986. Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis* 6: 505-510.
- PATSCH, J. 1987. Postprandial lipaemia. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metabolism* 1: 551-580.
- PICARD, S. 1998. LDL oxydées et athérosclérose. *Sang Thrombose Vaisseaux* 10 : 15-20.
- REAVEN, E., LEERS-SUCHETA, S., NOMOTO, A., AZHAR, S. 2001. Expression of scavenger receptor class B type 1 (SR-BI) promotes microvillar channel formation and selective cholesteryl ester transport in a heterologous reconstituted system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 1613-1618.
- RHAINDS, D., BOURGEOIS, P., BOURRET, G., HUARD, K., FALSTRAULT, L., BRISSETTE, L. 2004. Localization and regulation of SR-BI in membrane rafts of HepG2 cells. *J. Cell Sci.* 117: 3095-3105.
- RHAINDS, D., BRODEUR, M., LAPOINTE, J., CHARPENTIER, D., FALSTRAULT, L., BRISSETTE, L. 2003. The role of human and mouse hepatic scavenger receptor class B type 1 (SR-BI) in the selective uptake of low density lipoprotein cholesteryl esters. *Biochemistry* 42: 7527-7538.

- RHAINDS, D., FALSTRAULT, L., TREMBLAY, C., BRISSETTE, L. 1999. Uptake and fate of class B scavenger receptor ligands in HepG2 cells. *Eur. J. Biochem.* 261: 227-235.
- RIGOTTI, A., MIETTINEN, H., KRIEGER, M. 2003. The role of the high density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr. Rev.* 24: 357-387.
- RIGOTTI, A., TRIGATTI, B.L., PENMAN, M., ET AL. 1997. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12610-12615.
- ROBERTS, D.C., MILLER, N.E., PRICE, S.G., CROOK, D., CORTESE, C., LA VILLE, A., MASANA, L., LEWIS, B. 1985. An alternative procedure for incorporating radiolabelled cholesteryl ester into human plasma lipoproteins in vitro. *Biochem. J.* 226: 319-322.
- ROGLER, G., HEROLD, G., FAHR, C., FAHR, M., ROGLER, D., REIMANN, F.M., STANGE, E.F. 1992. High-density lipoprotein 3 retroendocytosis: A new lipoprotein pathway in the enterocyte (CaCo-2). *Gastroenterology* 103: 469-480.
- ROUFFY, J., CHANU, B., BAKIR, R., GOY-LOEPER, J., MIRO, I. 1983. Lipides, lipoprotéines, apolipoprotéines et manifestations cliniques artériopathiques. *Path. Biol.* 31 : 261-270.
- SCANU, A.M., LANDSBERGER, F.R. 1980. Lipoprotein structure. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 348: 1-436.
- SCHMITZ, G., ROBENEK, H., LOHMANN, U., ASSMANN, G. 1985. Interaction of high density lipoproteins with cholesteryl ester-laden macrophages: Biochemical and morphological characterization of cell surface receptor binding, endocytosis and resecretion of high density lipoproteins by macrophages. *EMBO J.* 4: 613-622.
- SILVER, D.L., TALL, A.R. 2001. The cellular biology of scavenger receptor class B type I. *Curr. Opin. Lipidol.* 12: 497-504.
- SILVIA, S.F., JEFFREY, M.H., GERD, A., BRYAN, B.J., ET AL. 2001. Lecithin Cholesterol Acyltransferase Deficiency and Fish Eye disease. In: CHARLES, R.S., ARTHUR, L.B., WILLIAM, S.S., ET AL. *O. M. M. B. I. D.* 8th ed. v. 2. New York, London: McGraw-Hill; chap. 118.

- SOUTAR, A.K., MYANT, N.B., THOMPSON, G.R. 1982. The metabolism of very low density and intermediate density lipoproteins in patients with familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 43: 217-231.
- SPRINGER, T.A. 1998. An extracellular beta-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor, and extracellular matrix components. *J. Mol. Biol.* 283: 837-862.
- SWINKELS, D.W., DEMACKER, P.N.M., HAK-LEMMERS, H.L.M., MOL, M.J.T.M., YAP, S.H., VAN'T LAAR, A. 1988. Some metabolic characteristics of low-density lipoprotein subfractions, LDL-1 and LDL-2: in vitro and in vivo studies. *Biochim. Biophys. Acta* 960: 1-9.
- SWINKELS, D.W., HENDRIKS, J.C.M., DEMACKER, P.N.M., STALENHOF, A.F.H. 1990. Differences in metabolism of three low density lipoprotein subfractions in Hep G2 Cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1047: 212-222.
- TENG, B., THOMPSON, G.R., SNIDERMAN, A.D., FORTEO, T.M., KRAUSS, R.M., KWITEROVICH, P.O. Jr. 1983. Composition and distribution of low density lipoprotein fractions in hyperapobetalipoproteinemia, normolipidemia, and familial hypercholesterolemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6662-6666.
- TERPSTRA, A.H., WOODWARD, C.J., SANCHEZ-MUNIZ, F.J. 1981. Improved techniques for the separation of serum lipoproteins by density gradient ultracentrifugation: visualization by prestaining and rapid separation of serum lipoproteins from small volumes of serum. *Anal. Biochem.* 111:149-157.
- TRIBBLE, D.L. 1995. Lipoprotein oxidation in dyslipidaemia: insights into general mechanisms affecting lipoprotein oxidative behaviour. *Curr. Opin. Lipidol.* 6: 196-208.
- TRIBBLE, D.L., HOLL, L.G., WOOD, P.D., KRAUSS, R.M. 1992. Variations in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of varying size and density. *Atherosclerosis* 93: 189-199.
- TRIGATTI, B., RIGOTTI, A., KRIEGER, M. 2000. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 11: 123-131.

- UEDA, Y., ROYER, L., GONG, E., ZHANG, J., COOPER, P.N., FRANCONI, O., RUBIN, E.M. 1999. Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 274:7165-7171.
- VAN BERKEL, T.J., OUT, R., HOEKSTRA, M., KUIPER, J., BIESSEN, E., VAN ECK, M. 2005. Scavenger receptors: friend or foe in atherosclerosis? *Curr. Opin. Lipidol.* 16: 525-535.
- VAN ECK, M., PENNING, M., HOEKSTRA, M., OUT, R., VAN BERKEL, T.J. 2005. Scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter A1 in reverse cholesterol transport and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 16:307-315.
- VERGEER, M., KORPORAAL, S.J., FRANSSEN, R., MEURS, I., OUT, R., HOVINGH, G.K., HOEKSTRA, M., SIERTS, J.A., DALLINGA-THIE, G.M., MOTAZACKER, M.M., HOLLEBOOM, A.G., VAN BERKEL, T.J., KASTELEIN, J.J., VAN ECK, M., KUIVENHOVEN, J.A. 2011. Genetic variant of the scavenger receptor BI in humans. *N. Engl. J. Med.* 2: 136-145.
- VINGE, J.L., HAVEL, R.J. 1981. Metabolism of apolipoprotein A-I of chylomicrons in rats and humans. *Can. J. Biochem.* 59: 613-708.
- VON ECKARDSTEIN, A., ROHRER, L. 2009. Transendothelial lipoprotein transport and regulation of endothelial permeability and integrity by lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.* 20: 197-205.
- WANG, L., CONNELLY, M.A., OSTERMEYER, A.G., CHEN, H-H., WILLIAMS, D.L., BROWN, D.A. 2003. Caveolin-1 does not affect SR-BI-mediated cholesterol efflux or selective uptake of cholesteryl ester in two cell lines. *J. Lipid Res.* 44: 807-815.
- WILLIAMS, D.L., CONNELLY, M.A., TEMEL, R.E., SWARNAKAR, S., PHILLIPS, M.C., DE LA LLERA-MOYA, M., ROTHBLAT, G.H. 1999. Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking. *Curr. Opin. Lipidol.* 10: 329-339.
- WILLIAMS, D.L., WONG, J.S., HAMILTON, R.L. 2002. SR-BI is required for microvillar channel formation and the localization of HDL particles to the surface of adrenocortical cells in vivo. *J. Lipid Res.* 43: 544-549.

- YAMAMOTO, T., DAVIS, C.G., BROWN, M.S., SCHNEIDER, W.J., CASEY, M.L., GOLDSTEIN, J.L., RUSSELL, D.W. 1984. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* 39: 27-38.

Sites Internet:

http://www.pharmaciedepouille.com/Cholesterol_hyperlipidemie.htm

<http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/SFbioch/POLY.Chp.5.html>